

TRABAJO FIN DE GRADO

**Grado en Ingeniería Química**

**ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DE METALES A PARTIR DE  
LA SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.**



**Memoria**

**Autor:** David Jiménez Alba  
**Director:** Antonio Florido Pérez  
**Co-Director:** Karina Torres-Rivero  
**Convocatoria:** Septiembre 2019



## Resum

L'ésser humà realitza moltes activitats que tenen una repercussió negativa al medi ambient. Una d'aquestes activitats són les operacions mineres, que poden contaminar les aigües superficials i subterrànies adjacents a la zona minera. Aquestes aigües contaminades es coneixen com aigües àcides de mines i posen en risc tant a l'ésser humà com a la flora i fauna de l'ecosistema, ja que no només tenen un baix pH sinó que també tenen una gran concentració de sulfats i metalls. És per això que existeix la necessitat de tractar-les per minimitzar en la mesura del possible els seus estralls.

Les nanopartícules estan sent àmpliament investigades i aplicades a diferents camps degut al seu ampli ràtio superfície-volum, que proporciona unes propietats úniques i molt millorades respecte del seu homòleg macroscòpic. Així, una de les seves aplicacions d'interès ambiental és l'adsorció dels contaminants presents a aquestes aigües àcides de mines

S'ha estudiat una metodologia d'extracció de metalls pesats a partir de nanopartícules de ferro encapsulades en polisacàrids d'origen natural. Aquesta aplicació podria donar pas a la recuperació de metalls escassos presents a les aigües àcides de mines. La recuperació d'aquests metalls, amenaçats pel seu creixent us a la fabricació de dispositius electrònics, tindria com a finalitat la seva reinserció a la cadena de subministrament, contribuint d'aquesta manera a l'economia circular.

## Resumen

El ser humano realiza muchas actividades que tienen una repercusión negativa en el medio ambiente. Una de ellas son las operaciones de minería, que pueden contaminar las aguas superficiales y subterráneas colindantes a la zona minera. Estas aguas contaminadas se conocen como aguas ácidas de minas y ponen riesgo la salud tanto del ser humano como de la fauna y flora del ecosistema, ya que no sólo tienen un bajo pH sino que contienen una gran concentración de sulfatos y metales. Es por eso que existe la necesidad de tratarlas para reducir en la medida de lo posible sus estragos.

Las nanopartículas están siendo ampliamente investigadas y aplicadas en diferentes campos debido a su amplio ratio superficie-volumen, que proporciona unas propiedades únicas y muy mejoradas en comparación con su homólogo macroscópico. Así, una de sus aplicaciones de interés ambiental es la adsorción de los contaminantes presentes en estas aguas ácidas de minas.

Se ha estudiado una metodología de extracción de metales pesados a partir de nanopartículas de hierro encapsuladas en polisacáridos de origen natural. Esta aplicación podría extenderse en trabajos posteriores a la recuperación de metales escasos presentes en las aguas ácidas de minas. La recuperación de estos metales, amenazados por su creciente uso en la fabricación de dispositivos electrónicos, tendría como finalidad su reinserción en la cadena de suministro, contribuyendo de esta manera en la economía circular.

## **Abstract**

Humans perform many activities that have a negative impact on the environment. One of them are mining operations, which can contaminate the superficial and underground water adjacent to the mining area. This contaminated water is known as acid mine drainage and it does not only place at risk the health of humans but it endangers as well the fauna and flora of the ecosystem, since this outflow has low pH and contains a high concentration of sulphates and metals. Therefore, there is a need to treat the drainage in order to reduce their harm as much as possible.

Nanoparticles are being widely investigated and applied in different fields due to their wide surface-volume ratio, which provides some unique and improved properties compared to their macroscopic counterpart. Thus, one of its applications of environmental interest is the adsorption of contaminants out of the acid mine drainages.

A methodology for the extraction of heavy metals from the encapsulation of iron nanoparticles in vegetal polysaccharides has been studied. This application could be extended in subsequent studies to the recovery of scarce metals present in the acid mine drainages. The recovery of these metals, threatened by their increasing use in the manufacture of electronic devices, would aim at their reintegration into the supply chain, thereby contributing to the circular economy.

## Agradecimientos

Quiero agradecer al director de mi proyecto, el Profesor Antonio Florido, y sobre todo a mis tutoras del proyecto, Karina Torres-Rivero y Sandra Espriu, del Departament d'Enginyeria Química de la EEBE, por su paciencia y esfuerzo durante la realización de este Trabajo Final de Grado.



## **Glosario.**

AgNPs: Nanopartículas de plata.

AuNPs: Nanopartículas de oro.

AMD (Acid Mining Drainage): Drenajes ácidos de minas.

EDX (Energy-Dispersive X-ray spectroscopy): Espectroscopia de rayos X por energía dispersiva.

FTIR (Fourier-Transform Infrared spectroscopy): Infrarrojos por transformada de Fourier.

MNPs: Nanopartículas metálicas.

NPs: Nanopartículas.

SEM (Scanning Electron Microscope): Microscopio electrónico de barrido.

TEM (Transmission Electron Microscope): Microscopio electrónico de transmisión.

TFG: Trabajo Fin de Grado.

UV/VIS (Ultraviolet-Visible spectroscopy): Espectroscopia ultravioleta-visible.

# Índex

<b>RESUM</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>GLOSARIO.</b>	<b>V</b>
<b>1. PREFACIO</b>	<b>9</b>
1.2. Origen del trabajo .....	9
1.3. Motivación .....	9
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
2.1. Objetivos del trabajo .....	11
2.1.1. Objetivo Principal.....	11
2.1.2. Objetivos Específicos.....	11
2.2. Alcance del trabajo .....	11
<b>3. INTRODUCCIÓN A LAS NANOPARTÍCULAS.</b>	<b>13</b>
3.1. Síntesis de las nanopartículas.....	14
3.1.1. Síntesis mediante los métodos <i>Top Down</i> .....	16
3.1.2. Síntesis mediante los métodos <i>Bottom Up</i> .....	17
3.1.3. Síntesis biológica de MNPs. ....	18
3.1.4. Métodos de síntesis verde de MNPs .....	19
3.1.5. Síntesis verde de MNPs a partir de extracto de raspo de uva .....	25
3.2. Caracterización de las MNPs. ....	27
<b>4. MICROCÁPSULAS DE ALGINATO COMO ENCAPSULADOR DEL EXTRACTO.</b>	<b>31</b>
4.1. Introducción.....	31
4.2. Estructura molecular y composición de los alginatos.....	31
4.3. Química del Alginato.....	32
4.4. Formación de microcápsulas de polisacáridos. ....	34
4.5. Encapsulación en Alginato.....	34
4.6. Técnicas de microencapsulación .....	35
4.7. Equipos de encapsulación. ....	37
4.8. Alternativas al alginato .....	38



<b>5.</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>41</b>
5.1.	Procedimiento Experimental	41
5.1.1.	Tamaño de las perlas de polisacárido.	41
5.1.2.	Efecto del pH.	42
5.1.3.	Tiempo de contacto	44
5.2.	Esquema experimental propuesto	45
5.2.1.	Preparación del extracto vegetal y disolución del polisacárido.	46
5.3.	Cálculos de preparación de las muestras	52
5.3.1.	Preparación de la disolución metálica:	53
5.3.2.	Preparación del extracto vegetal.	54
5.3.3.	Preparación de las disoluciones de los polisacáridos	54
5.3.4.	Preparación las disoluciones de Cr (VI)	54
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>PRESUPUESTO Y ANÁLISIS ECONÓMICO</b>	<b>59</b>
7.1.	Estudio bibliográfico y dedicación.	59
7.2.	Presupuesto del diseño experimental.	60
<b>8.</b>	<b>ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>65</b>



# **1. Prefacio**

## **1.2. Origen del trabajo**

El presente trabajo final de grado forma parte del proyecto de investigación “Síntesis verde de nanopartículas metálicas a partir de aguas ácidas de minas y extractos de residuos agroalimentarios”, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid y Fondos FEDER, EU, 2016-2018 (proyecto CTM2015-68859-C2-2-R; MINECO/FEDER). El proyecto se desarrolla por el grupo R2EM, Resource Recovery and Environmental Management, dentro del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC) en colaboración con la Universitat de Girona (UdG).

## **1.3. Motivación**

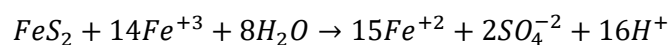
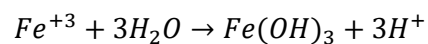
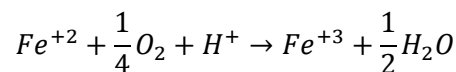
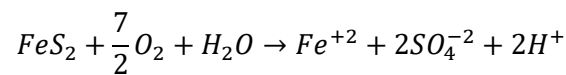
Las operaciones de minería conllevan a la formación de afluentes ácidos llamados AMD (Acid Mine Drainage), por sus siglas en inglés. Se definen como AMD los efluentes ácidos producidos en las minas que contienen altas concentraciones de elementos tóxicos tales como metales y aniones que causan contaminación en las aguas de las zonas donde ocurre la explotación minera (Cánovas, et al., 2018). Las investigaciones que se llevan a cabo en la actualidad se enfocan en encontrar alternativas para la extracción y separación de los metales del lixiviado ácido, con el fin de eliminar los compuestos más peligrosos o para recuperar metales de alto valor comercial con aplicaciones específicas y así reducir el impacto ambiental de las AMD.

La nanoremediación de zonas contaminadas con metales pesados ha sido reportada en varios estudios, los cuales han demostrado que es posible la recuperación de metales tales como el Cromo VI, (Casal, 2015), (Bhateria & Singh, 2019), (Piao, et al., 2012), el Cadmio (II) (Hongfei, et al., 2014) etc., empleando nanopartículas metálicas (MNPs) sintetizadas a partir de compuestos inocuos para el medio ambiente.

## 2. Introducción

Las operaciones de la minería comercial originan la formación de AMDs, que se producen debido a la presencia de grandes cantidades de sulfuros que generan ambientes ácidos que promueven la solubilización de metales.

La circulación del agua dentro de las galerías de las minas y en los relaves de las mismas promueve la meteorización oxidativa de los sulfuros y la formación de efluentes con alto potencial de contaminación, los cuales migran fácilmente a varios sistemas naturales (aguas subterráneas, sistemas fluviales y suelos). Esta meteorización, se puede describir usando una variedad de ecuaciones que sin embargo, son representaciones aproximadas de un proceso natural complejo que refleja lo siguiente resultados:



Algunas de las situaciones más problemáticas causadas por el drenaje ácido y metalífero son el impacto ambiental en la calidad del agua, el impacto en el ecosistema fluvial y el impacto visual, siendo un verdadero problema en las zonas mineras. (Favas, et al., 2019)

El rápido crecimiento de la nanotecnología y su paulatina aplicación en diversos campos de la ciencia han fomentado un intenso desarrollo de nuevos materiales. Una de las áreas en las que se ha enfocado la investigación ha sido la remediación de suelos y aguas contaminadas. (Araújo, et al., 2015)

Los metales de alto valor comercial que contienen los lixiviados ácidos pueden ser extraídos empleando técnicas de encapsulamiento con micro o nano esferas (Bhateria & Singh, 2019) empleando un agente encapsulante que sea respetuoso con el medio ambiente (Arenas, 2017). Metales pesados como el arsénico, cadmio, cromo, plomo y mercurio están categorizados como altamente tóxicos, provocando importantes daños a la salud, inclusive a bajas concentraciones (Bhateria & Singh, 2019).

Sin embargo, estos metales se podrían recuperar, reinsertándolos en la cadena de suministro y contribuyendo así a la economía circular.

Es importante destacar que bajo ciertas condiciones de temperatura y pH, las nanopartículas tienden a formar aglomeraciones, las cuales dificultan su interacción con los contaminantes. Es por ello que en el presente trabajo se estudia el uso de materiales que agreguen estabilidad a las MNPs y mejoren su efectividad. En este caso, se estudia el uso de alginato, y quitosano como agentes encapsulantes.

## **2.1. Objetivos del trabajo**

### **2.1.1. Objetivo Principal**

Plantear una metodología para la recuperación de Cromo (VI) a partir de la interacción con nanopartículas de hierro encapsuladas en un polisacárido de origen natural.

### **2.1.2. Objetivos Específicos**

- Analizar el estado del arte para la obtención de MNPs específicamente enfocado en los siguientes aspectos:
  - Obtención de MNPs para la recuperación de metales pesados.
  - Efecto de los agentes reductores de origen natural en la obtención de MNPs.
  - Efecto estabilizante de los polisacáridos planteados como agentes encapsulantes (alginato de sodio y quitosano).
  - Efecto del pH, tiempo de contacto y tamaño de las microcápsulas en la extracción de Cr (VI).
- Proponer un esquema experimental que permita realizar el estudio de las variables arriba mencionadas.
- Realizar una estimación económica del esquema experimental.
- Plantear un procedimiento de gestión de residuos para el esquema experimental.

## **2.2. Alcance del trabajo**

Determinar las condiciones de operación para la obtención de MNPs de metales pesados tales como el Cr (VI), poniendo en contacto la disolución de este metal con nanopartículas de hierro obtenidas por síntesis verde, empleando alginato de sodio y quitosano como agentes encapsulantes y raspo de uva como agente reductor.



### 3. Introducción a las Nanopartículas.

La nanotecnología es una de las áreas emergentes de investigación más importantes en la era moderna. La ciencia de los materiales y las nanopartículas (NPs) se utilizan en muchos ámbitos, creando un impacto en el medio ambiente, la salud, la industria cosmética, la electrónica, etc. Las NPs son la forma más simple de estructuras con un rango de tamaño de 1–100 nm y con propiedades únicas debido a su elevada relación superficie-volumen.

El uso de NPs en diferentes campos como la biología molecular, la física, la catálisis, la química orgánica, la medicina y la ciencia de los materiales ha aumentado de manera exponencial. La disminución de tamaño desde partícula a nanopartícula demuestra propiedades peculiares y mejoradas como su misma morfología, que es diferente en partículas más grandes de un mismo material. (Prasad, et al., 2019).

Las NPs se dividen ampliamente en varias categorías dependiendo de su morfología, tamaño y propiedades químicas. La Figura 1 muestra la clasificación más común.

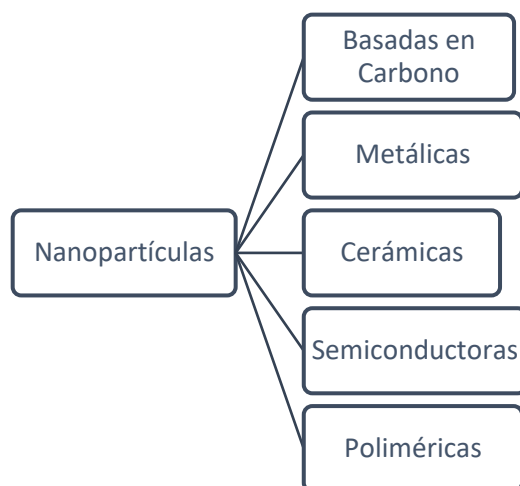


Figura 1. Esquema de clasificación de las nanopartículas. (Khan, et al., 2017)

Las NPs generalmente se clasifican morfológicamente (forma, tamaño y dimensión), químicamente (orgánico, inorgánico, metálico, no metálico y magnético), por fuentes y según sus métodos de síntesis (físicos, químicos y biológicos) (Ramzan & Yousaf, 2018). Dentro de esta clasificación destacan las Nanopartículas metálicas (MNPs) que tienen propiedades completamente diferentes a su metal en función de sus características específicas tales como su forma o la distribución de sus partículas. (Kumar, et al., 2019).

Grandes avances han tenido lugar en la síntesis de partículas de tamaño nanométrico empleando diversas vías de obtención. Las nanopartículas se sintetizan comúnmente usando dos estrategias: *Top-Down* ("de arriba abajo") y *Bottom-Up* ("de abajo arriba"). En el enfoque *Top-Down*, los materiales son gradualmente

descompuestos en materiales de tamaño nanométrico, mientras que en el enfoque *Bottom-Up*, los átomos o las moléculas se ensamblan a estructuras en rango nanométrico. Ésta vía de obtención ascendente es comúnmente utilizada en la síntesis química y biológica de nanopartículas.

La Figura 2 muestra la aplicación del dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), de acuerdo al tamaño de sus partículas. Por ejemplo las nanopartículas menores a 50 nm pueden ser empleadas para disminuir el efecto de coloración blanquecina al aplicar el protector solar en la piel.

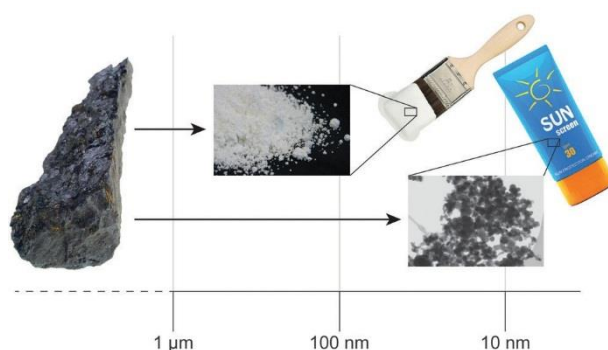


Figura 2. Empleo de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en la elaboración de bloqueadores solares. (Stark, et al., 2015).

Otra de las aplicaciones más significativas es el desarrollo de materiales para la fabricación de celdas solares donde se buscan metales, en forma de NPs, que mejoren el efecto de dispersión de la energía colectada en toda la superficie de la celda, de manera de que no se generen zonas muertas. Otro ejemplo es la utilización de NPs de óxido de cinc para mejorar la dispersión de pigmentos en pinturas de base acuosa. También se han desarrollado membranas de separación con moléculas diseñadas empleando MNPs, las cuales tienen aplicación en la construcción de catalizadores debido a la gran área superficial que pueden ofrecer (Stark, et al., 2015).

### 3.1. Síntesis de las nanopartículas.

La selección de un método de obtención de nanopartículas es de gran importancia debido a que durante el proceso se presentan interacciones de los iones metálicos con el agente reductor así como interacciones entre el agente estabilizante y la nanopartícula las cuales influyen de manera directa en la morfología, la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas (Prasad, et al., 2019).

La síntesis de las MNPs se realiza por varias vías, tales como los métodos físicos, químicos o electroquímicos, algunos de ellos empleando alta tecnología como la ablación láser o la fotoreducción entre otras técnicas. (Narayanan & Sakthivel, 2010).



Otra manera de obtener las MNPs consiste en aplicar energía mecánica directamente sobre el material de partida para dividirlo en partículas cada vez más pequeñas, hasta llevarlos al rango de dimensión que corresponde a las MNPs. Este proceso, no químico, requiere equipos de fresado complejo (Stark, et al., 2015).

La Figura 3 muestra las vías de obtención con dos ejemplos que se llevan a cabo en la industria como son la obtención de NPs de plata (AgNPs) y la obtención de NPs de carbonato de calcio.

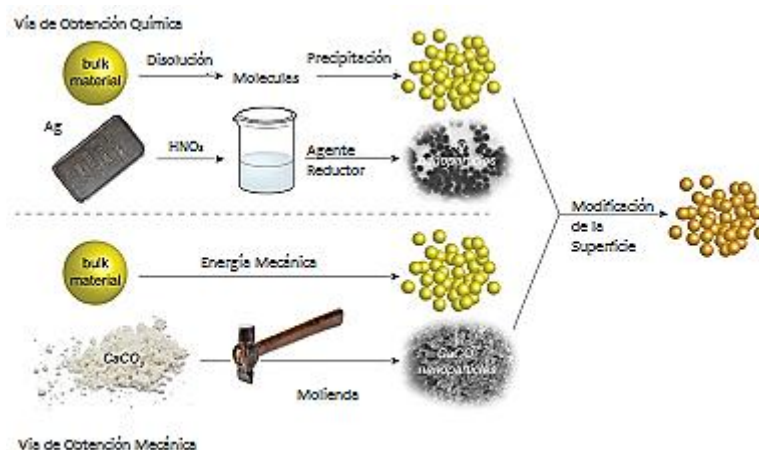


Figura 3. Dos vías tradicionales para la obtención de MNPs.  
(Stark, et al., 2015)

Existen diferentes vías para la obtención de las MNPs, las cuales son clasificadas en dos grupos como los métodos agrupados en el término *Bottom-up* y los métodos de *Top-down*. La Figura 4 muestra un esquema de las diferentes vías de fabricación de las MNP. (Prasad, et al., 2019)

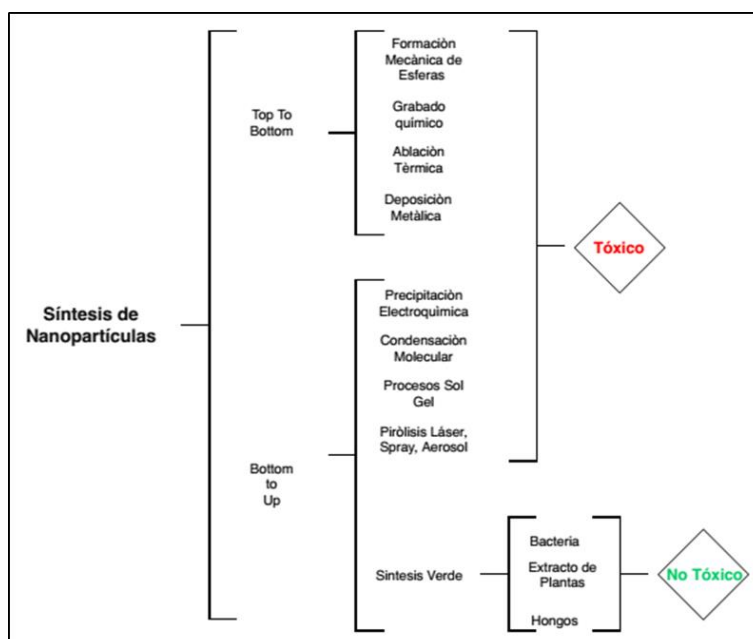


Figura 4. Diferentes enfoques de síntesis de MNPs de plata (Shakeel, et al., 2016).

### 3.1.1. Síntesis mediante los métodos *Top Down*

En estos métodos, el material de partida es convertido en partículas de menor tamaño mediante diferentes tratamientos fisicoquímicos. Esto incluye, por ejemplo, molienda mecánica, térmica y ablación láser. Los métodos *Top Down* son fáciles de implementar pero tienen limitaciones importantes en cuanto a la uniformidad de los tamaños de partículas por lo que se recurre siempre a técnicas adicionales para obtener distribuciones de tamaños de partículas adecuadas. (Prasad, et al., 2019)

Los métodos *Top Down* tienen la desventaja de que se debe utilizar una cantidad importante de energía para alcanzar condiciones de presión y de temperatura lo suficientemente altas para lograr partículas de forma y tamaño bien definidas (Ramzan & Yousaf, 2018). A continuación se presentan las técnicas más utilizadas:

***Molienda con Bolas (Ball Milling):*** En este método el material de partida es colocado en una cámara junto con varias esferas pesadas que se hacen rotar de forma que las esferas colisionen con el material y lo rompan, formando así partículas cada vez más pequeñas junto con una alta cantidad de energía aplicada al sistema hasta obtener un tamaño de partícula adecuado. El sólido que se obtiene tiene propiedades superficiales mejoradas, comparado con el material de origen. El resultado tiene una distribución de tamaño de partícula homogénea para una determinada cantidad de sólido. Sin embargo, los costes asociados al uso de energía por un tiempo prolongado es la principal desventaja de éste método de obtención (Prasad, et al., 2019).

***Síntesis Fisicoquímica:*** Se basa en someter al material de partida a deformaciones sucesivas y luego mezclar este sustrato con algunos reactivos que modifican el material durante el proceso de molienda. En general, se necesita que estos procesos se lleven a cabo a altas temperaturas para que luego tengan lugar las reacciones químicas. En algunos casos, se necesitan procesos adicionales para separar las nanopartículas formadas de los reactivos que no se consumieron durante la etapa de reacción (Ramzan & Yousaf, 2018).

***Ablación Láser:*** Esta vía de obtención de MNPs ha sido muy estudiada. La técnica tradicional consiste en moldear la estructura de partida hasta obtener partículas del tamaño en escala nano. El material es colocado bajo el rayo láser y es sometido al mismo durante breves segundos, con el objetivo de lograr esferas de tamaño uniforme las cuales se encuentran contenidas en una disolución acuosa formando una disolución coloidal. La duración del pulso láser y la energía empleada determinan la cantidad relativa de partículas formadas (Prasad, et al., 2019). Este proceso se encuentra esquematizado en la Figura 5.

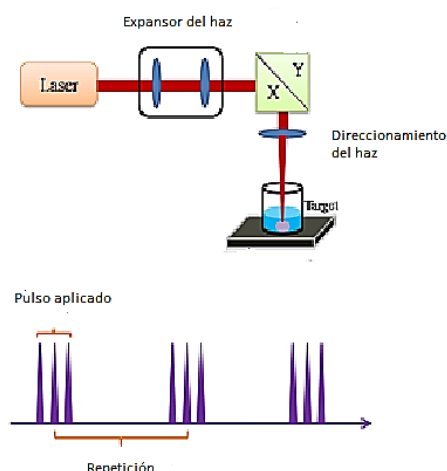


Figura 5. Esquema de un equipo empleado en la ablación láser además del tipo de señal de pulso que se emplea (Yu, et al., 2017).

**Pulverización Iónica:** El método de pulverización iónica consiste en la vaporización de un sólido mediante la pulverización catódica con un haz de iones de gas inerte. Tradicionalmente, este método se emplea para la preparación de nanopartículas de varios metales, empleando una cámara de vacío donde ocurre la electrodeposición de las MNPs. En este lugar se suministra un voltaje muy alto produciendo la migración de las MNPs al cátodo de un sistema magnético.

### 3.1.2. Síntesis mediante los métodos *Bottom Up*

Esta vía de obtención se basa en la formación de MNPs a partir de elementos pequeños (iones o una sola molécula). Se distinguen tres vías que se muestran a continuación:

**Deposición Química de Vapor:** En este método se deposita una fina lámina del material de partida en una superficie, donde entra en contacto con un compuesto gaseoso que contiene átomos útiles para la formación de una película. Cuando la fase gaseosa es vapor de agua se dice que ocurre una deposición térmicamente activa. También es posible que la fase gaseosa sea un plasma que se genera en una cámara de vacío, donde entra en contacto con la delgada película del material de partida. Este método tiene como principal ventaja la obtención de MNPs morfológicamente bien definidas (Bhateria & Singh, 2019).

**Método Sol Gel:** La síntesis de MNPs ocurre empleando una disolución coloidal del metal, la cual se combina con una sustancia gelatinosa para formar una red en la fase continua que generalmente es el gel. El método sol gel involucra cuatro etapas principales: hidrólisis, condensación, crecimiento de partículas y aglomeración de partículas (Ramzan & Yousaf, 2018).

**Método de reducción química:** En este método se produce la reducción del ion de una disolución acuosa en presencia de un agente surfactante. Se emplean agentes reductores como el borohidruro de sodio, el cual es

usado en disolución acuosa. Las nanopartículas formadas son estabilizadas por el agente surfactante (Prasad, et al., 2019).

### **3.1.3. Síntesis biológica de MNPs.**

Debido a la creciente necesidad de diseñar procesos de síntesis de NPs más rentables y con menor impacto ambiental, los métodos de síntesis biológica han ganado importancia. Con este propósito, muchos organismos biológicos o inclusive parte de ellos han sido estudiados y empleados para producir MNPs (Pérez, 2014).

La producción de MNPs mediante el uso de algas, hongos, bacterias y plantas puede llegar a ser muy ventajosa en cuanto a la obtención de partículas con tamaños de hasta 5 nm. Esto se debe a que estos organismos contienen metabolitos, enzimas, proteínas y otros factores necesarios para la fabricación de NPs, tanto dentro como fuera de la célula (Ramzan & Yousaf, 2018).

Las MNPs sintetizadas mediante esta vía, poseen propiedades farmacológicas que se emplean en el diagnóstico y tratamiento de patologías que por sus características requieren mecanismos de degradación específicos, sin la utilización de materiales tóxicos en las rutas de síntesis (Mahato, 2017).

Las implicaciones del uso de estas especies las hace comercialmente atractivas aunque tengan otras áreas de aplicación como es el caso de la catálisis de reacciones complejas y la remediación de aguas y suelos, como el caso de estudio que se plantea en esta investigación. Algunas de las especies más comunes son: nanopartículas de cobalto, cobre, plata, oro, silicio, paladio, platino, iridio y magnetita.

La Figura 6 muestra los tamaños asociados a las MNPs de acuerdo a su origen biológico.

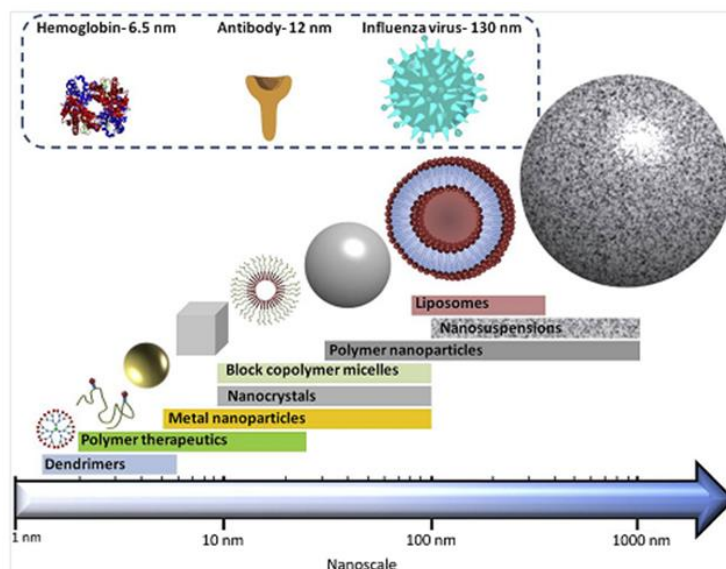


Figura 6 Tamaño de las MNPs de acuerdo a su origen biológico (Mahato, 2017).

#### 3.1.4. Métodos de síntesis verde de MNPs

Existe una necesidad de conseguir vías de obtención de MNPs que sean rentables y al mismo tiempo seguras y ecológicas. Los métodos químicos necesitan sustancias que son peligrosas en su manejo y tóxicas en su disposición, y los métodos físicos requieren de una gran cantidad de energía y estrictos controles de presión y temperatura para la obtención de las diferentes nanoestructuras (Kumar, et al., 2019).

Sin embargo los métodos de síntesis verde (por ser el color tradicionalmente asociado al respeto del medio ambiente) se presentan como una alternativa simple y atractiva económicamente sin la acumulación de grandes cantidades de sustancias tóxicas que suelen acarrear un coste adicional relacionado con su disposición segura (Dubey, et al., 2009).

En la última década se han demostrado que muchos sistemas biológicos que incluyen plantas y algas (Haytham, 2015) (Ravindra & Mohan, 2010) (Sathishkumar, et al., 2009) (Ahmed, et al., 2016), bacterias, levaduras y hongos (Kumar, et al., 2019) pueden transformar iones metálicos inorgánicos en MNPs a través de las capacidades reductoras de las proteínas y metabolitos presentes en estos organismos (Makarov, et al., 2014).

La síntesis verde de MNPs se puede dividir en dos categorías de acuerdo a la fuente orgánica de la que provienen:

El método I se refiere al uso de plantas (incluye algas marinas) para la fabricación de MNPs, el método II por su parte abarca un procedimiento que implica el uso de bacterias y microorganismos para la síntesis de las MNPs.

Para llevar a cabo la obtención de las NPs se deben tener ciertas consideraciones en el momento de elegir el agente reductor que se quiere utilizar en la síntesis de las MNPs, y así obtener MNPs que sean estables y que puedan ser caracterizadas de forma adecuada. Los aspectos más importantes a considerar (Iravani, 2011) son:

**Selección del mejor organismo:** Para elegir los mejores candidatos para la obtención de MNPs es necesario enfocarse en las propiedades intrínsecas más importantes, tales como actividad enzimática o el potencial para la acumulación de metales pesados

**Condiciones óptimas para el crecimiento celular y actividad enzimática:** En el caso de las bacterias y hongos debe conocerse las condiciones en las cuales se produce el crecimiento de estos organismos, por ejemplo: temperatura, pH o cantidad de luz.

**Condiciones óptimas de reacción:** Cuando se trata de llevar los procesos de obtención de MNPs a escala industrial, el rendimiento y la velocidad de producción son las cuestiones más importantes a considerar. Por otra parte, se necesita optimizar las condiciones de bioreducción en la mezcla de reacción.

#### **3.1.4.1. Método I: Síntesis de MNPs a partir de plantas.**

Existen plantas capaces de reducir iones metálicos en su superficie. Por otra parte, los bajos costes asociados a los cultivos de determinadas especies, y los cortos tiempos de producción hacen que esta vía de obtención sea de interés científico y comercial (Makarov, et al., 2014).

Las nanopartículas que provienen de las plantas, tienen una amplia gama de aplicaciones como se muestra en la Figura 7.

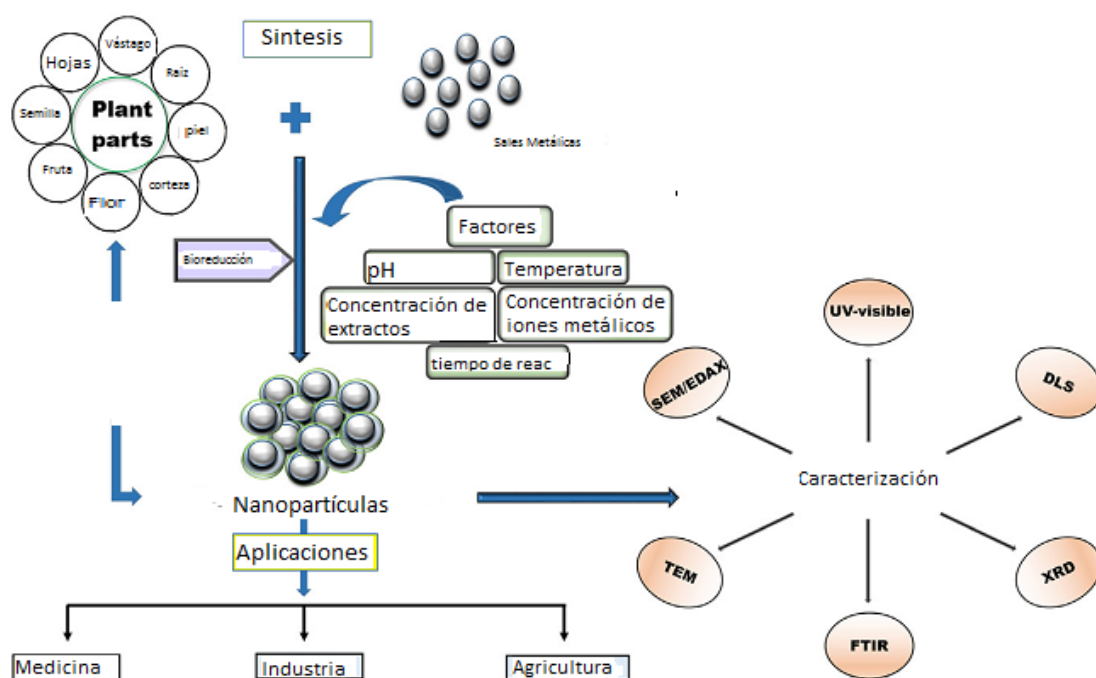


Figura 7. Representación esquemática de la síntesis, caracterización y aplicaciones de las NPs obtenidas por el método I (Kumar, et al., 2019).

Un punto importante a considerar es la forma en que se obtienen estas NPs, con el fin de establecer claramente la influencia de los diferentes parámetros operacionales que pueden controlarse. Es por esto que se han planteado diferentes mecanismos de reacción que ocurren durante la síntesis. Así, varios mecanismos han sido reportados para la fitosíntesis de NPs, involucrando enzimas y proteínas en la fase de reducción del metal, debido a una interacción electrostática del metal con los grupos funcionales anclados en la superficie de la proteína o de la enzima. Existen otros autores que aseveran que los compuestos con gran poder de reducción como los flavonoides o los fenoles son los que tendrían a cargo la tarea de reducir el metal, soportando estas observaciones con caracterizaciones realizadas durante las síntesis como la espectrofotometría por transformada de Fourier (FTIR), sin encontrar evidencia de compuestos como proteínas o enzimas. Los grupos hidroxilo serían los responsables de la reducción de los metales (Narayanan & Sakthivel, 2010) (Kumar, et al., 2019).

Este método contempla tres fases a seguir para la determinación de las MNPs cuando se parte de plantas y algas (Ramzan & Yousaf, 2018).

Las diferentes etapas se muestran a continuación en la Figura 8.

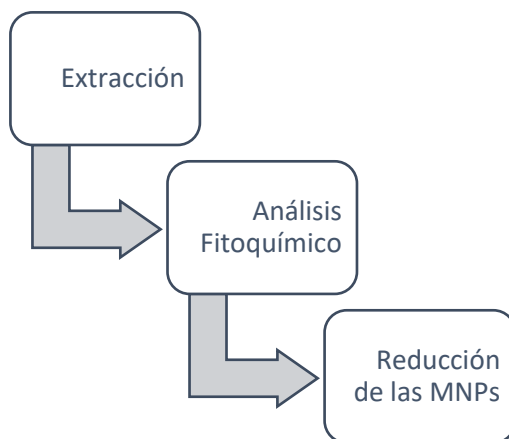


Figura 8. Etapas en la fabricación de MNPs por el método I (Ramzan & Yousaf, 2018).

### Extracción

La extracción de la materia orgánica se realiza mediante la maceración con metanol o agua desionizada y usando el método de extracción de Soxhlet. Las extracciones realizadas con alcoholes, tales como metanol, etanol y acetato de etilo, garantizan que las propiedades de las MNPs obtenidas no sean modificadas (Shashi et al., 2010).

El extracto crudo es filtrado y evaporado hasta convertirse en un fluido un poco más denso. El extracto obtenido es almacenado a temperaturas cercanas a cero grados para ser usado en futuros ensayos (Ramzan & Yousaf, 2018).

La Tabla 1 siguiente muestra ejemplos de diferentes vías de obtención de diferentes MNPs:

Tabla 1. Algunas vías de obtención de MNPs (Iravani, 2011).

Metal	Método de obtención
Oro	Reducción de sales de oro, irradiación UV, ablación, reducción química, síntesis biológica.
Plata	Evaporación y condensación, reducción química, ablación láser, microemulsión, síntesis biológica.
Paladio	Reducción química, síntesis biológica.
Oxido de Zn	Proceso de Sol Gel, oxidación en fase vapor, microemulsión, precipitación electroquímica, síntesis biológica.
Magnesio	Descomposición térmica, síntesis hidrotérmica, síntesis biológica, síntesis por microemulsión.
Cobre	Reducción térmica, oxidación en fase vapor, ablación, síntesis biológica.



## **Análisis Fitoquímico**

El análisis fitoquímico es un ensayo cuyo objetivo es determinar las capacidades reductoras de las especies a partir de su composición. Este ensayo es considerado una buena práctica para determinar la actividad superficial y asegurar que los compuestos presentes en la fuente biológica sean los adecuados para que se lleve a cabo la formación de las NPs. Los análisis fitoquímicos buscan la existencia de constituyentes activos tales como, alcaloides, flavonoides, esteroides, proteínas, saponinas y glicósidos los cuales reducen los metales (Dubey, et al., 2009).

Con el fin de asegurar el potencial de la materia vegetal que empleó en su trabajo de investigación, Casal (2015) realizó la determinación volumétrica del potencial redox de la biomasa, utilizando un electrodo de Pt conectado a un potenciómetro de pH/mV *HANNA HI 84244*.

Posteriormente obtuvo la capacidad antioxidante mediante la determinación de los polifenoles totales por medidas espectrofotométricas mediante ensayos de Folin-Ciocalteu (Casal, 2015) (Arenas, 2017).

## **Reducción de las MNPs**

La reducción de MNPs es la tercera etapa en la cual el ion metálico es preparado en una disolución acuosa con agua desionizada, de manera que se evita que la presencia de otros minerales pueda interferir.

La concentración del extracto es siempre mucho más grande que la disolución salina del ion metálico para asegurar buenos resultados. Algunas veces se precisa una etapa de asentamiento o de reposo a temperaturas de alrededor de 50 °C para asegurar una completa reducción de los metales. Emplear temperaturas mayores puede causar la degradación de la disolución. Una forma de saber cuándo se han comenzado a formar las MNPs es el cambio de color de la mezcla de reacción (Casal, 2015).

Una de las ventajas principales de emplear materiales biológicos de partida es que no se necesita añadir estabilizadores debido a que los extractos de plantas contienen proteínas y aminoácidos que hacen estas funciones de estabilización (Arenas, 2017).

La Figura 9 muestra los diferentes compuestos que participan en la bio-reducción de los metales.

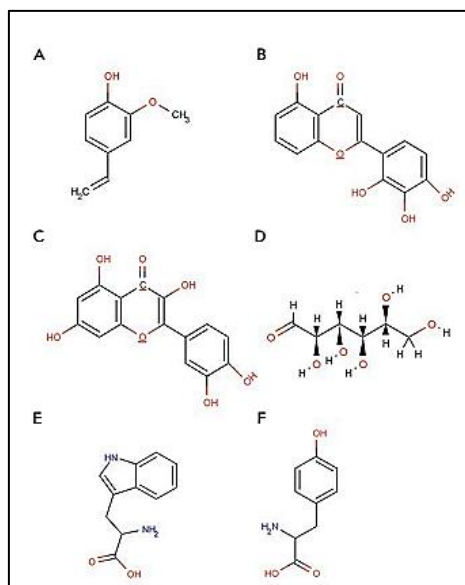


Figura 9. Los principales tipos de metabolitos vegetales involucrados en la síntesis de las nanopartículas metálicas: (A) terpenoides (eugenol); (B), (C) - flavonoides (luteolina, quercetina); (D) - hexosa reductora con la forma de cadena abierta; (E), (F) – aminoácidos (triptófano (E) y tirosina (F)) (Makarov, et al., 2014).

Los iones metálicos que generalmente se encuentran en disolución acuosa son reducidos convirtiéndose en MNPs. Empleando espectroscopia infrarroja se ha demostrado que los terpenoides son una clase de polímero orgánico sintetizado en plantas a partir de isoprenos que a su vez son compuestos con un rol muy importante debido a su potencial antioxidante. Por otra parte los flavonoides son compuestos polifenólicos que contienen varios grupos funcionales, responsables de llevar a cabo la reducción de los iones metálicos a MNPs. Por ejemplo, los grupos cetónicos y su conversión a ácidos carboxílicos participan activamente en la reducción de los iones metálicos (Makarov, et al., 2014).

#### 3.1.4.2. Método II: Síntesis de MNPs a partir de bacterias y microorganismos.

El método se basa en la obtención de MNPs empleando como fuente de materia biológica hongos y bacterias.

La biosíntesis de NPs a partir de bacterias y hongos sigue un proceso de reducción y una etapa de estabilización, en los que una bacteria es capaz de llevar a cabo la reducción de un metal bajo condiciones ambientales.

Los métodos de obtención de AuNPs y AgNPs se encuentran documentados de forma exhaustiva, debido a su atractivo valor comercial. Estas vías de obtención tienen dos grandes ventajas, la primera es el bajo impacto ambiental asociado a la producción de los microorganismos de una manera renovable y la segunda es el bajo coste operacional ya que no se necesitan sustancias adicionales ni cantidades de energía grandes para que se lleve a cabo la reducción del metal y la posterior estabilización de las NPs (Kitching, et al., 2015). La Figura 10 muestra el mecanismo propuesto por Kitching (2014)

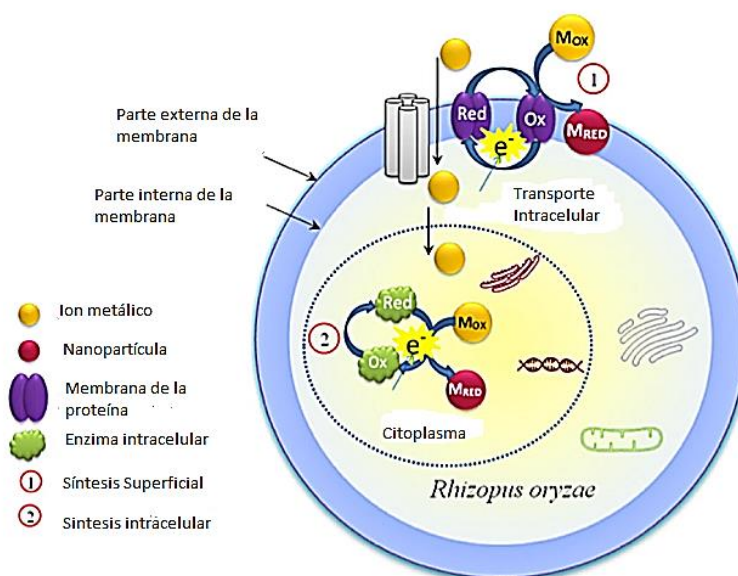


Figura 10. Esquema de un mecanismo propuesto de biomineralización de una MNP en *Rhizopus oryzae* (Kitching, et al., 2015).

En cuanto a la obtención de NPs partiendo de hongos, debido a su tolerancia y capacidad de bioacumulación de metales, resulta también una alternativa interesante. Por otro lado, una de las principales desventajas de esta vía de obtención es que se obtienen NPs con una morfología muy cambiante en un tamaño que oscila entre 5 y 50 nm (BoMoghaddam, et al., 2015).

### 3.1.5. Síntesis verde de MNPs a partir de extracto de raspo de uva

La utilización de los subproductos vinícolas está ganando cada vez más atención debido a sus prometedoras aplicaciones finales. Uno de sus usos es la eliminación de metales pesados presentes en aguas residuales industriales, debido a su capacidad de sorción de éstos. Por ejemplo, se ha comprobado que el raspo tiene más capacidad de retener metal que el carbón activo tanto granular como en polvo (Arenas, 2017). Otra aplicación que está en estudio es su utilización en la síntesis de MNPs, la cual se ha llevado a cabo dando buenos resultados para la preparación de AgNPs (Arenas, 2017). La Figura 11 muestra el esquema simplificado para la obtención de nanopartículas empleando extractos vegetales.

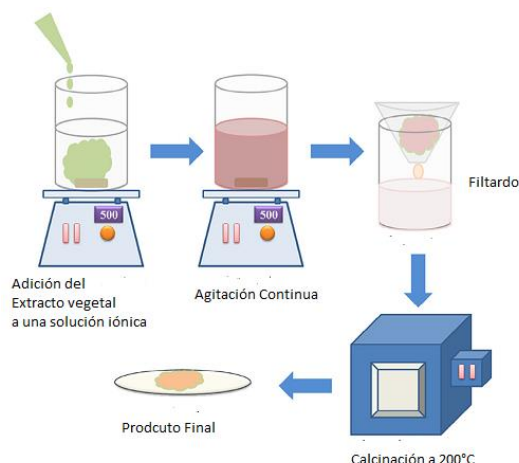


Figura 11. Esquema simplificado para la fabricación de MNPs (Gomathi, et al., 2017).

La reducción del ion metálico contenido en una disolución se ha llevado a cabo por Krishnaswamy y colaboradores (2014) aprovechando las diferentes partes de la planta de uva, como se muestra en la Figura 12, en la que se observa la forma en que el extracto se preparó. Se colocaron las semillas en contacto con el agua, la piel y los tallos de las uvas y los calentó a 60 °C por dos minutos obteniendo disoluciones coloreadas que luego fueron filtradas y finalmente puestas en contacto con la sal de oro para formar las AuNPs. (Krishnaswamy, et al., 2014)



Figura 12. Esquema de la elaboración de extractos de raso de uva en la obtención de nanopartículas de oro. (Krishnaswamy, et al., 2014).

Se ha reportado la obtención de AgNPs, (Bastos, et al., 2018) a partir de residuos de la uva empleando extractos acuosos. Se encontró que existen compuestos en la materia vegetal que contribuyen a la reducción de los iones en disolución y a su estabilización.

Uno de los mecanismos de reacción para la reducción de los iones metálicos se muestra en la Figura 13, donde se observa la formación de un compuesto intermediario llamado semiquinona, el cual se reestructura para formar una molécula compleja sobre la cual ocurre la reducción y estabilización de las MNPs (Krishnaswamy, et al., 2014).

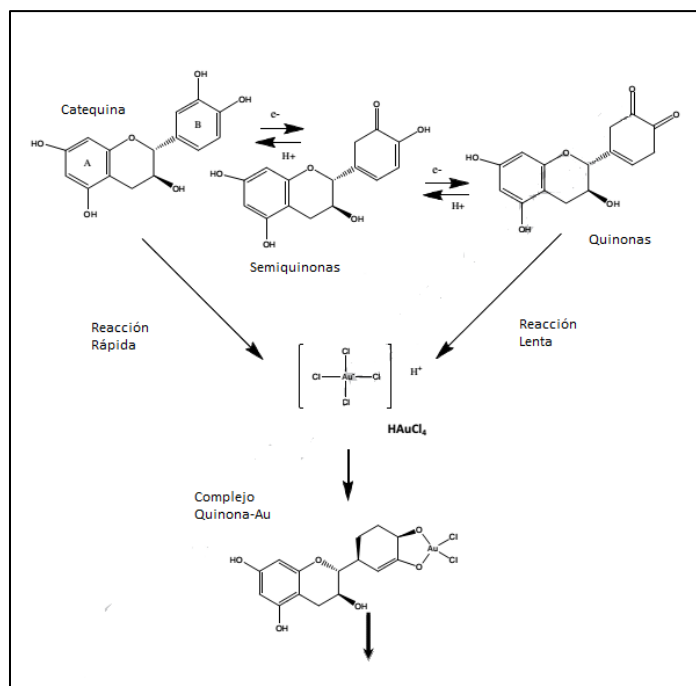


Figura 13. Mecanismo de formación del complejo catequina-NP (Krishnaswamy, et al., 2014).

En otro ejemplo, Sathishkumar et al. (2009) realizaron un estudio con *Canela zeylanicum*. Se utilizó la corteza de esta planta en polvo y en forma de extracto. Se mezclaron la disolución de extracto y nitrato de plata en una proporción de 2: 5 a 25°C durante 2 horas a 160 rpm, ajustando el pH de forma variable entre 1 y 10. El resultado obtenido fue la producción de AgNPs esféricas, con un tamaño de 40 nm.

### 3.2. Caracterización de las MNPs.

Las diferentes técnicas para la caracterización de las nanopartículas metálicas permiten determinar información sobre el tamaño, forma y patrón de dispersión. Las técnicas más comunes son las siguientes:

- Espectrometría de ultravioleta visible (UV-Vis):

Es una técnica de caracterización simple y rápida empleada en la monitorización de las reacciones de síntesis de las MNPs.

En la espectrometría de ultravioleta visible, un haz que va desde la fuente de luz al detector, se toma una primera medición sin la interacción de la muestra y se usa como el haz de referencia. El haz que pasa a través de la muestra interactúa con esta. La energía absorbida excita un electrón a un orbital molecular más elevado cuando la longitud de onda emitida corresponde al nivel de energía de dicho electrón. De esta manera, las medidas de absorbancia dependerán de la concentración de la muestra (Titus, et al., 2019).

Con la espectrometría UV se busca determinar la longitud de onda de las disoluciones que contienen las MNP, las cuales cambian de color a medida que éstas se van formando (Iravani, 2011).

- Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM):

Mediante esta técnica se pueden observar la forma y el tamaño de las MNPs sintetizadas (Ramzan & Yousaf, 2018). Un haz de electrones se emite e incide sobre la muestra y la energía desprendida varía con las diferentes áreas por las que pasa el haz de electrones. (Pereira, et al., 2019)

Un esquema simplificado es mostrado en la Figura 14, en donde se observan los lentes primarios encargados de enfocar el haz de electrones hasta hacerlo pasar por una apertura cuya amplitud puede ser manipulada para intensificar la imagen. Una vez el haz de electrones pasa por la muestra se encuentra con las lentes, que realizan los diferentes enfoques que informan la forma de la muestra, hasta que se proyecta en la pantalla (Titus, et al., 2019).

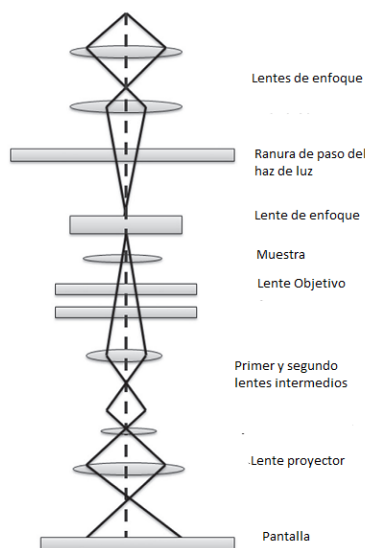


Figura 14. Componentes básicos del TEM (Titus, et al., 2019).

- Microscopia Electrónica de Barrido (SEM):

La caracterización del escaneo de electrones se emplea para determinar el tamaño, forma y morfologías de las nanopartículas formadas. Proporciona imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra. El

microscopio electrónico de barrido funciona como el mismo principio que un microscopio óptico, pero mide los electrones dispersos de la muestra. Debido a que los electrones pueden ser acelerados si se les induce un potencial eléctrico, la longitud de onda se puede hacer más corta que la de los fotones. Esto hace que el SEM sea capaz de ampliar imágenes hasta 200,000 veces las imágenes escaneadas. Con esta técnica se mide el tamaño de partícula con una sensibilidad de hasta 1 nm. (Heera & Shanmugam, 2015)

Una representación del microscopio se muestra en la Figura 15.

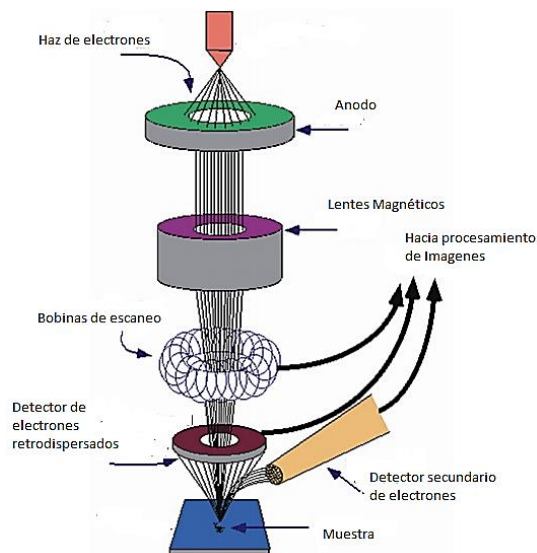


Figura 15. Diagrama esquemático de SEM.

- Espectroscopia de Infrarrojos.

La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) es utilizada en síntesis biológica y utiliza muestras secas, por lo que las nanopartículas metálicas se secan y luego se muelen gracias a equipos diseñados para llevar a cabo esta función. Con esta técnica se busca encontrar el mecanismo de formación de los enlaces de las amidas en las estructuras de las proteínas, ya que deben desplegarse y acomodarse de manera que los grupos carbonilos de sus aminoácidos permiten la reducción de los iones metálicos para unirse fácilmente con estos grupos carbonilos libres (Narayanan & Sakthivel, 2010). Balaji y colaboradores (2009), estudiaron dos bandas en el espectro infrarrojo a  $1640$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$ , donde identificó los enlaces de las amidas en su trabajo de obtención de nanopartículas de plata a partir de un tipo de hongo. Con el análisis infrarrojo se confirmó que el grupo carbonilo que proviene de los aminoácidos residuales y de las pectinas de las proteínas tiene la capacidad de anclar el ion metálico. (Balaji et al., 2008).

La Figura 16 muestra las diferentes técnicas de caracterización y su aplicación:

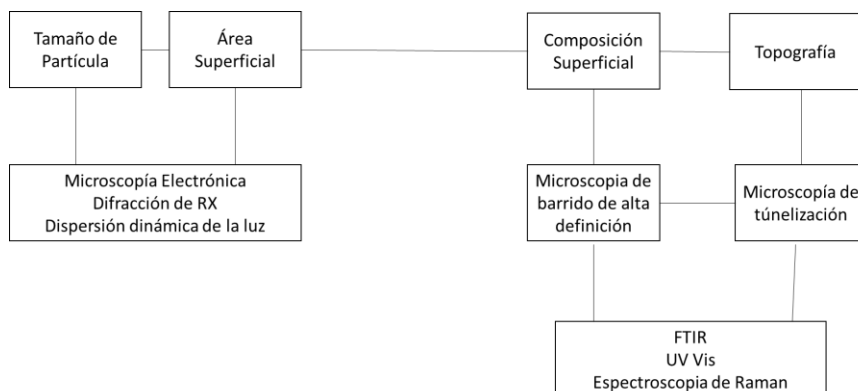


Figura 16. Métodos de Caracterización de MNPs (Titus, et al., 2019).



## 4. Microcápsulas de alginato como encapsulador del extracto.

### 4.1. Introducción

Los alginatos son los polisacáridos más abundantes en las algas marinas, conformando hasta el 40% de su peso en seco. Son los componentes estructurales de la pared celular de las algas, cuya función principal es aportar rigidez, elasticidad y flexibilidad a esta pared (Lee & Mooney, 2012).

El término alginato es comúnmente empleado para referirse al ácido algínico y sus sales, pero también es común el empleo de los derivados de este ácido en la industria alimenticia y farmacéutica, por su capacidad de retener agua, capacidad de gelificación, viscosidad, así como, sus propiedades estabilizantes (Casal, 2015).

Generalmente, los alginatos se obtienen a partir de la extracción de las algas marinas mediante un proceso que empieza con el tratamiento del material vegetal seco con ácido mineral, del que se obtiene el ácido algínico tras su purificación.

Posteriormente se emplea una base como el carbonato de calcio para transformarse en su sal básica tal y como se ilustra en la Figura 17, sin embargo, comercialmente son obtenidos a gran escala a partir de la fermentación microbiana y pueden ser sales de calcio, sodio o de amonio (Szekalska et al., 2016) (Avendaño et al., 2013).

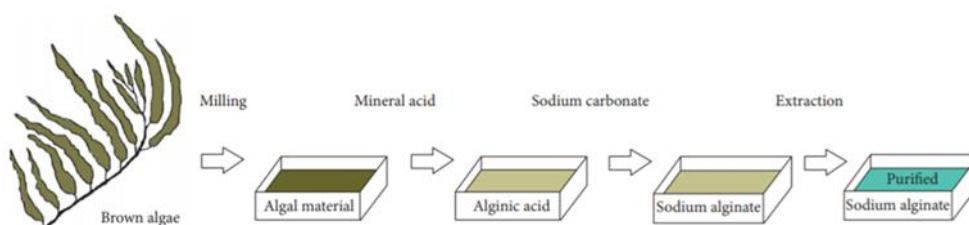


Figura 17 Procedimiento típico de extracción de alginatos de algas marinas (Szekalska, et al., 2016).

### 4.2. Estructura molecular y composición de los alginatos

El alginato se presenta en forma de polímero conformado por dos monómeros monosacáridos: el ácido manurónico (M) y el ácido glucorónico (G). La estructura básica de los alginatos consiste en unidades lineales, no ramificadas, de polímeros conformados por los monómeros M y G, alternando zonas formadas por diferentes proporciones de los mencionados monómeros, denominadas bloques como se observa en la Figura 18 (Ching et al., 2015).

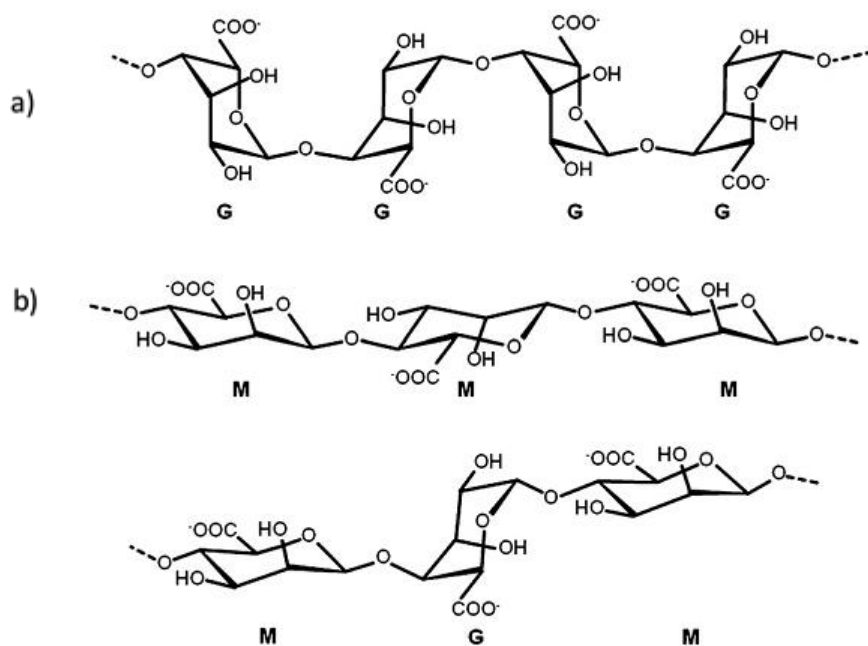


Figura 18. Estructura química de los monómeros que conforman los alginatos (a) Polímero del alginato (b) Diferentes distribuciones (bloques) de los monómeros en la cadena de alginato (Lee & Mooney, 2012).

La topología de los bloques de alginato varía considerablemente según la composición de monómeros presentes en la cadena. Así, las regiones donde prevalecen los residuos del monómero M (ácido marunórínico) son planas en comparación con las conformadas principalmente por el monómero G (ácido glucorínico) que conforman una superficie irregular. También cabe destacar que los bloques G funcionan como unión entre cadenas mientras que los bloques M son los que interactúan con el agua. La asociación entre cadenas de alginato puede presentarse de diversas maneras según la cantidad de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , otorgando diferentes propiedades fisicoquímicas al polímero, como viscosidad, rigidez, etc. (Lee & Mooney, 2012).

Al aumentar el peso molecular se pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas del gel resultante. Sin embargo, una disolución formada por alginatos de muy alto peso molecular puede resultar muy viscosa, una propiedad no tan apreciada en las distintas aplicaciones (Thakur, et al., 2018).

### 4.3. Química del Alginato.

La estructura molecular del alginato explica la interacción de la molécula con los diferentes compuestos, tales como los iones divalentes, los cuales determinan las características de las disoluciones del compuesto. En el caso de los iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$ , se asocian con los bloques tipo G, los cuales se muestra en la Figura 188. Esta interacción específica da origen a propiedades físicas que promueven la formación de hidrogeles.

Las propiedades mecánicas de los geles de alginato varían al aumentar la longitud del bloque G y el peso molecular del polímero. (Lee & Mooney, 2012)

La estructura química del alginato se muestra en la Figura 19a. Sun y Tan (2013), propusieron un mecanismo de interacción del alginato con un metal genérico en base a una revisión bibliográfica que realizaron sobre el uso del alginato como agente encapsulante para diferentes moléculas. Los autores establecen que el alginato contiene bloques de ácido manurónico con estructuras beta D que se nombra como monómero M y alfa L-ácido gulorónico a la que se nombra monómero G. En la parte a, se observa la estructura de los monómeros que conforman la molécula y en la parte b la interacción de los grupos oxi hidrolizados, lo que genera una atracción electrostática por las cargas parciales opuestas.

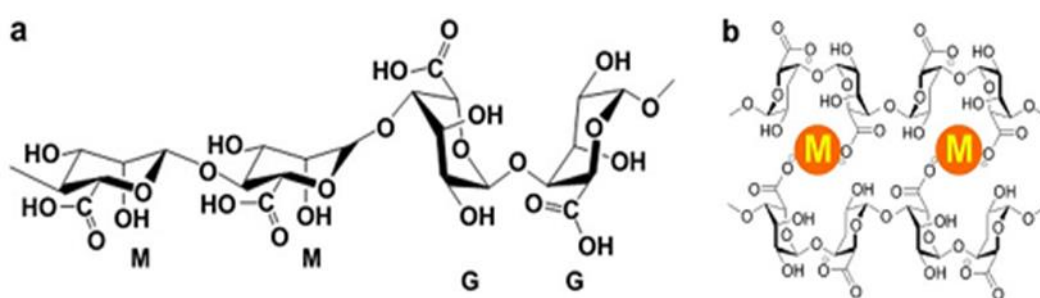


Figura 19. (a) Estructura química propuesta por los autores. (b) Mecanismo de interacción iónica entre el alginato y un catión divalente (Zhang, et al., 2018).

La presencia de los iones divalentes puede promover la formación de estructuras del tipo caja de huevos, como se muestra en la Figura 19b. Estas estructuras son las que inducen a la gelificación de las disoluciones de alginato. La tasa de gelificación es uno de los parámetros más importantes a considerar cuando se busca formar estructuras con determinada forma geométrica y, a su vez, conservar la integridad mecánica de dichas estructuras (Szekalska, et al., 2016).

Una forma de reducir la velocidad a la cual ocurre la gelificación es agregar sales fosfatadas tales como el hexametáfosfato de sodio que compite con los iones metálicos divalentes en la formación de enlaces con los grupos carboxilo disminuyendo la formación del gel (Zhang, et al., 2018).

Otro aspecto resaltante que tiene relación con la estructura del alginato es el proceso de gelificación el cual es de gran importancia en el proceso de encapsulamiento y que depende del pH. A pH bajo las estructuras carboxílicas son estables y solo hay interacción de los iones divalentes con los grupos  $\text{COO}^-$  presentes en los bloques G. Sin embargo, a pH muy bajos puede darse la desnaturalización de los enlaces cetónicos perdiendo la estructura molecular. Por otra parte, a pH muy altos se considera que de los grupos hidroxilo sale un protón ( $\text{H}^+$ ) y esta carga parcial negativa atrae a los iones monovalentes en disolución, por ejemplo el  $\text{Na}^+$ , disociando así la estructura (Lee & Mooney, 2012).

#### **4.4. Formación de microcápsulas de polisacáridos.**

Una microcápsula es una membrana semiesférica, denominada matriz, que rodea un núcleo compuesto por lo que se denomina comúnmente como fase interna, pudiendo ser esta un principio activo de un fármaco o el material de interés a encapsular. Las estructuras tienen un diámetro que varía de pocos micrómetros a 1000  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a los materiales empleados para la microencapsulación, comúnmente los alginatos son usados por su propiedad hidrofílicas, la facilidad en la manipulación además de ser de gran interés en la industria alimenticia por sus propiedades como gelificante, estabilizante y espesante. (Lupo, et al., 2012)

#### **4.5. Encapsulación en Alginato**

El alginato es uno de los polímeros comúnmente empleados para el proceso de microencapsulación por su capacidad de gelificación y bajo coste, pudiendo emplearlo en grandes procesos industriales, en contraste con el quitosano o el ácido hialurónico (Spedalieri, 2015).

Dentro de las propiedades más importantes del alginato relacionadas con la microencapsulación se encuentran las siguientes:

- La encapsulación se puede dar a temperatura ambiente.
- No requiere solventes orgánicos tóxicos.
- Tiene un elevado grado de porosidad

El proceso de formación del gel comienza con la combinación de una disolución de sal de alginato y una fuente de calcio desde donde el ion calcio se difunde hasta llegar a la cadena polimérica. De esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio lo que resulta en un material sólido con las características de un gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y el contenido de los G-bloques (Lupo, et al., 2012).

La metodología comúnmente empleada para encapsular, usando el alginato como matriz, consiste en gotear una disolución de en una disolución de catión divalente que se quiere encapsular, como se observa en la Figura 2020a, obteniendo cápsulas cuyas propiedades estructurales son controladas según las concentraciones de las disoluciones ya mencionadas. Cuando la disolución de alginato entra en contacto con la disolución de catión entrecruzante, instantáneamente se forma una capa de gel superficial con un centro líquido, siguiendo los principios de la gelificación externa (Spedalieri, 2015). Así, a medida que se van

desplazando los cationes divalentes por las perlas de alginato se va formando la microcápsula tal y como se muestra en la Figura 20b.

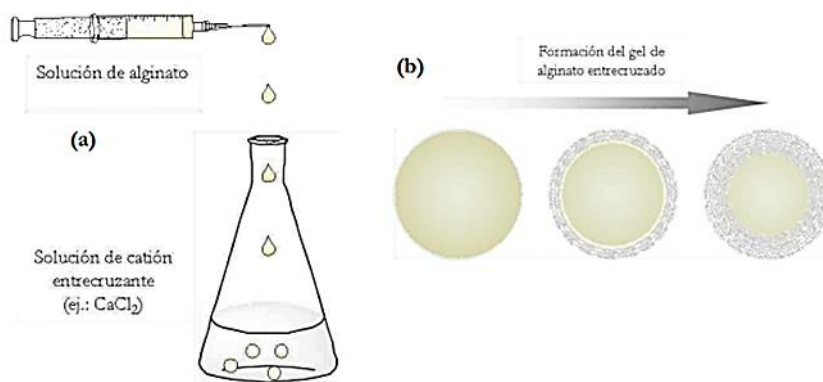


Figura 20. (a) Esquema de obtención de cápsulas de hidrogeles de alginato entrecruzados por método de goteo. (b) Esquema de formación radial del gel de alginato en las cápsulas (Thakur, et al., 2018).

Se han desarrollado metodologías alternativas para mejorar el control sobre el tamaño final de las cápsulas, para obtener distintas morfologías de hidrogeles o incluso para cambiar la dinámica con la cual las disoluciones de alginato y entrecruzante entran en contacto (Danish & Gundabala, 2017). Sin embargo, para la encapsulación de sistemas biológicos, la obtención de cápsulas por goteo sigue siendo la práctica comúnmente más utilizada.

## 4.6. Técnicas de microencapsulación

La microencapsulación puede llevarse a cabo mediante distintas técnicas. La selección de la más adecuada depende principalmente de la naturaleza del material al que se va a someter el proceso (pudiendo abarcar desde pequeñas moléculas inorgánicas hasta macromoléculas como enzimas), el mecanismo de liberación gradual del compuesto encapsulado y el costo asociado según las necesidades (Martín et al. 2009).

Los mecanismos de gelificación del alginato están basados en la formación de una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica para la protección de componentes activos de factores como el calor y la humedad, mejorando así su estabilidad y biodisponibilidad. Entre las técnicas para producir microcápsulas, la gelificación iónica se encuentra entre las más usadas. El proceso puede ocurrir por gelificación iónica de forma externa o interna (Imeson et al. 2010).

La Figura 21 muestra el proceso de microencapsulación propuesto por Zang y colaboradores (2018), en el cual se observa que podría existir una interacción electrostática entre las cargas parcialmente negativas en algunos sitios del alginato y el medio ácido en el cual se recomienda que se lleve a cabo el proceso de microencapsulado.

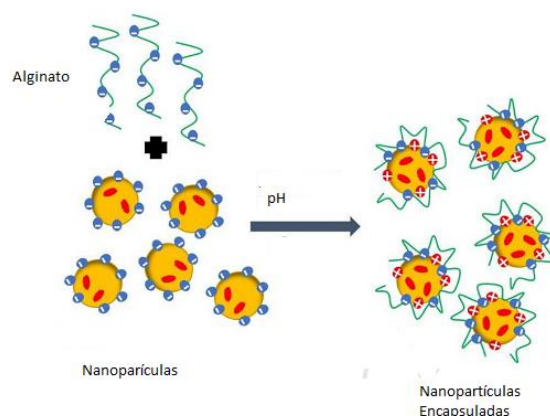


Figura 21. Formación de Microcápsulas con alginato (Zhang, et al., 2018).

- Encapsulación en emulsión

En la técnica de encapsulación en emulsión, se emplea el principio de la dispersión de dos líquidos entre sí. Es decir, se basa en la formación de una emulsión. Generalmente se añade un tensoactivo para mejorar la eficiencia del proceso, pudiendo aplicar un proceso de gelificación externa o interna según las propiedades deseadas (Lupo et al., 2012).

- Encapsulación mediante secado por atomización

En esta técnica, una emulsión conformada por el polímero y el material a encapsular es pulverizada sobre gas a altas temperaturas, promoviendo la deshidratación de la mezcla, secando la emulsión preparada y permitiendo la oclusión del material en el polímero, formando así las microcápsulas. El posterior enfriamiento del gas permite separar las micropartículas obtenidas. La simplicidad del proceso, además de ser útil para materiales sensibles a altas temperaturas, tiene un tiempo de exposición muy corto, que es la principal ventaja de esta técnica (Lupo et al. 2012).

- Encapsulación por extrusión

La encapsulación por extrusión es de las técnicas más empleadas para la formación de microcápsulas. Consiste básicamente en la formación de pequeñas gotas conformadas por el polímero con el material a encapsular mediante un dispositivo extrusor. Se induce entonces la gelificación externa, controlando los parámetros del proceso tales como la distancia de separación de la boquilla al baño, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la disolución que induce la gelificación que son responsables del tamaño de las esferas que se obtienen (Lupo et al. 2012). En la Figura 262 se muestra la técnica de microencapsulación por extrusión.

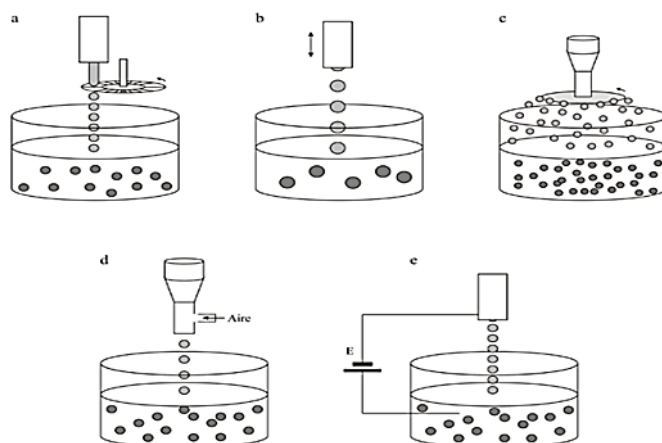


Figura 22. Microencapsulación por extrusión a: Atomizador con corte sistemático del chorro. b: Boquilla vibratoria. c: Disco atomizador. d: Flujo de aire coaxial. e: Potencial electroestático (Lupo, et al., 2012).

#### 4.7. Equipos de encapsulación.

En los últimos años, se han desarrollados equipos que mediante mecanismos sencillos de funcionamiento forman partículas pequeñas que van desde los 10  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$ , y que pueden encapsular materiales de interés. En el caso de las NPs, se emplean frecuentemente equipos encapsuladores que ayuden a regular el tamaño de las esferas.

La casa Büchi (Roma, Italia) ha desarrollado una encapsuladora (Modelo B-390) la cual es un instrumento semiautomático utilizado para la encapsulación de polímeros de sustancias químicas, bio-moléculas, fármacos, aromas, pigmentos, extractos, células y microorganismos. Las condiciones de trabajo asépticas son posibles, porque todas las partes en contacto con la mezcla de encapsulación se encuentran en condiciones controlables de presión y temperatura.

La Figura 23 muestra un diagrama esquemático de la encapsuladora en la que se ven los principales componentes de la misma.

El primer componente señalado con el número 1 es la botella presurizada que contiene la disolución de la que provendrán las MNPs, el elemento 2 es el lugar donde se deposita la disolución y es sometida a un campo vibracional controlado por los elementos 3 y 7, el elemento 4 es un dispensador que deja caer la disolución sobre un electrodo, que se señala con el elemento 5, el cual junto al elemento 6 forman las partículas con un determinado tamaño.

El elemento 8 es una luz led que se encarga de controlar el tamaño de la partícula y esa información es retroalimentada al control de vibraciones donde se ajusta de acuerdo a los requerimientos del usuario. Por

último se encuentra el baño de polimerización donde se forma la estructura deseada, dando lugar a una buena distribución de tamaños de partículas al final de cada experimento.

Cuando se alcanzan los parámetros óptimos, una cadena permanente de pequeñas gotas es claramente visible. Una vez establecidos los parámetros adecuados de acuerdo a la aplicación para la cual se sintetizan, se pueden preestablecer para las siguientes ejecuciones de producción de gotas con la misma mezcla de encapsulación.

Dependiendo de varias variables, tales como pH, concentración de la disolución iónica o concentración de encapsulante, se generan hasta 6000 gotas por segundo y se recolectan en el baño de polimerización, que se mezcla continuamente mediante una barra de agitación magnética. Por último, es importante destacar que la botella presurizada donde se encuentra la disolución de la reacción está conectada a tierra para eliminar las cargas electrostáticas provenientes de la carga generada en la superficie de la gota.

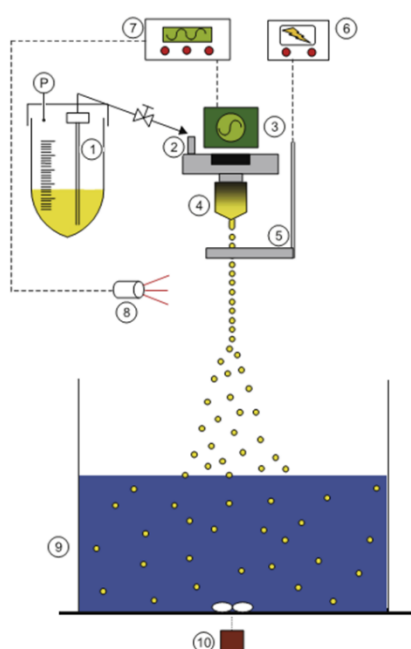


Figura 23. Esquema de funcionamiento de la encapsuladora Büchi B-390.

#### 4.8. Alternativas al alginato

El alginato no es el único material que puede emplearse como material encapsulante. Tal como demuestran distintas publicaciones, se puede emplear almidón de tapioca oxidado el cual ha demostrado tener una mayor capacidad de carga (hasta 33% mayor) amplificando las propiedades antioxidantes del material encapsulado (Palupi et al. 2016).



Otros materiales comúnmente usados son el quitosano, los caseinatos, celulosa modificada, gelatina (solubles en agua) o también alcoholes grasos, ácidos grasos, ceras naturales o polietileno (no solubles en agua). La selección del material depende mucho de las propiedades deseadas, como por ejemplo el mecanismo de liberación u otras propiedades fisicoquímicas, por lo que es común encontrar como material encapsulante una mezcla de polímeros o de biopolímeros, por ejemplo alginato y agar agar (Velimirovic, 2016)

El quitosano ha mostrado propiedades interesantes tales como biocompatibilidad y biodegradación, además no es tóxico, ni cancerígeno, por lo que se le ha considerado como una excelente alternativa en la elaboración de estabilizantes para MNPs. Muchas de las aplicaciones que se han implementado han sido médicas, debido a la inocuidad de la molécula.

Una de las características que resalta a la molécula de quitosano, la cual se muestra en la Figura 24, es el grupo amino que tiene un papel fundamental en la retención de las MNPs.

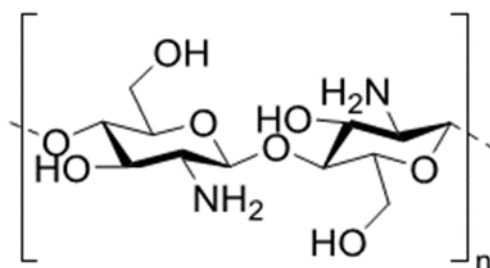


Figura 24. Estructura de la molecula del quitosano (Prado-Gotor et al., 2014).

Las características fisicoquímicas del quitosano son altamente dependientes del peso molecular, de la distribución de las cadenas lineales, la densidad de carga, la distribución de densidad y el grado de deacetilación, el cual se refiere a la cuantificación de la solubilidad del quitosano en agua. (Beulah, et al., 2018). La eficiencia del quitosano se establece por la funcionalidad de sus propiedades y va de la mano con el uso potencial del mismo. La incorporación de uno o más compuestos bajo ciertas condiciones de fabricación puede darle características exclusivas para una tarea específica. Además posee propiedades biorenovables que lo hacen muy atractivo en comparación con otros biopolímeros. (Beulah et al., 2018).



## 5. Diseño Experimental

A continuación, se pretende presentar un diseño experimental para el estudio de determinadas variables en la recuperación de metales mediante el uso de encapsuladores. Para ello se hará uso del diseño factorial, cuyo objetivo es evaluar cómo influyen  $k$  factores en un proceso y descubrir si interaccionan entre ellos, el diseño factorial completo  $2^k$  es la estrategia experimental óptima, pues permite explorar una zona escogida del dominio experimental y encontrar una dirección prometedora para la optimización posterior. (Álvarez-Gil, et al., 2018)

Se estima realizar un diseño que tenga la forma del modelo experimental  $2^K$  donde  $K$  representa tres factores a considerar y la base, es decir el número 2, será una variable base que se supone no tiene relación directa con las variables que forman el conjunto  $K$ .

### 5.1. Procedimiento Experimental

#### 5.1.1. Tamaño de las perlas de polisacárido.

Las metodologías empleadas en los trabajos precedentes (Arenas, 2017) (Casal, 2015) (Fiol, et al., 2005) (Franconetti, et al., 2018) tienen en común el uso de biopolímeros, los cuales se agregan en la parte final de las diferentes vías de síntesis y se les da forma a las esferas para darle estabilidad y un tamaño definido de acuerdo al uso que se le da a las MNPs.

En el caso de las esferas de hierro en agar agar que realizó Velimirovic (2016) se empleó el ultrasonido para dar forma y tamaño adecuado a las estructuras de hierro cerovalente. En este trabajo de investigación se probaron diferentes agentes estabilizadores tales como goma arábica, goma de guar, almidón y carboximetilcelulosa (CMC). Se demostró que si bien las esferas eran estables, no eran adecuadas para la remediación de contaminantes en suelos debido a la poca capacidad para interactuar con éstos (Velimirovic, 2016).

Casal (2015) empleó alginato para crear perlas de hierro, pero el método de obtención fue diferente debido a que se partió de una disolución acuosa, por lo que se obtienen iones en disolución que, al contacto con el biopolímero forma las esferas, a diferencia de Velimirovic, (2016) que empleó un polvo finamente molido, que a la vista del microscopio tiene aspecto de hojuela de 10 nm de espesor o menos.

Una vez sintetizadas las esferas de alginato que contienen en su interior las MNPs se estudia la morfología de las mismas empleando técnicas de difracción, como las descritas en el punto 3.2. Por ejemplo, Shakeel y colaboradores (2016) emplearon TEM para determinar la morfología de las AgNPs que obtuvieron y determinaron un tamaño promedio de 10 nm. Además se empleó espectroscopia infrarroja para determinar la presencia de grupos carbonilo, hidroxilo, amino y otras estructuras estables que luego contribuyeron a la eliminación de contaminantes o a la acción bactericida para la que fueron diseñadas.

La Figura 25 muestra el esquema de los dos procedimientos establecidos que obtuvieron tamaños de perlas entre 60 y 80 nm y que emplearon biopolímeros como estabilizantes. (Casal, 2015) (Velimirovic, 2016)

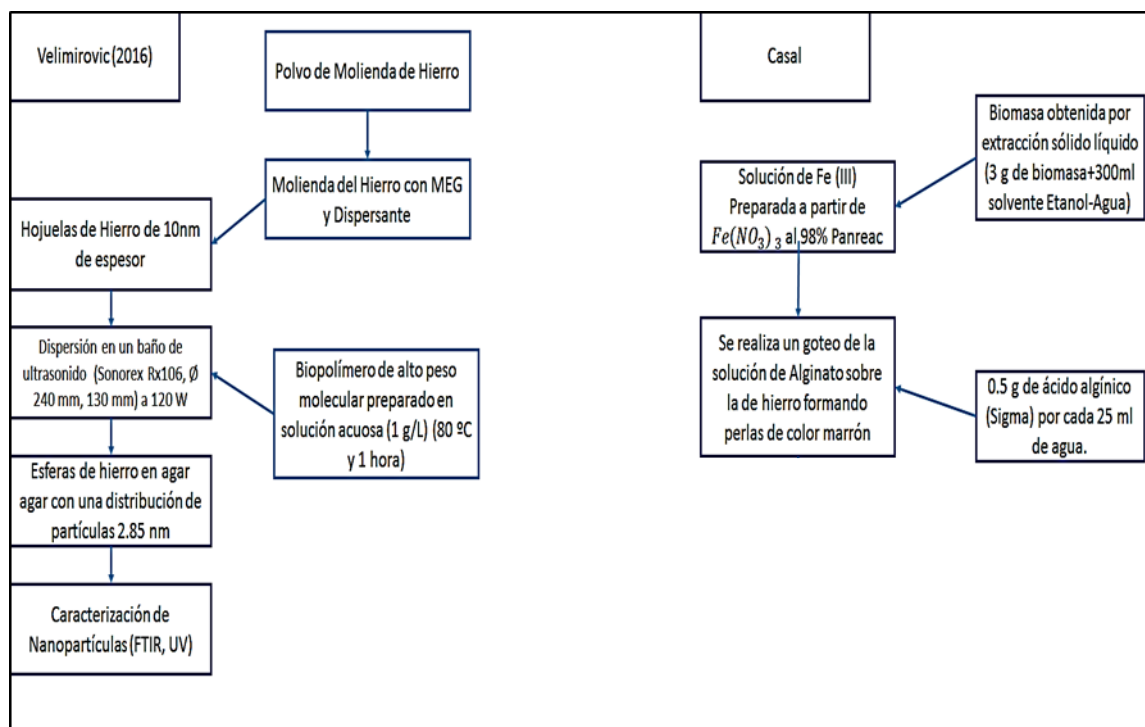


Figura 25. Procedimiento para la obtención de MNPs de hierro según trabajos precedentes.

Diferentes estudios sobre la estabilidad de las NPs obtenidas han demostrado eficiencia del agar agar, el alginato y el quitosano. (Velimirovic, 2016), (Franconetti et al., 2018), (Németh, 2015), por lo que la experimentación planteada abarca al menos el estudio de dos estabilizantes, el alginato y el quitosano.

### 5.1.2. Efecto del pH.

Uno de los parámetros más importantes en la obtención de MNPs es el pH. Su influencia ha sido ampliamente estudiada en la bibliografía, desde la formación que no involucra la agregación de estabilizantes hasta aquellos procesos en los que interfieren estructuras carbonadas complejas que dan estabilidad a las nanoestructuras.

Cuando se trata de la formación de MNPs a partir de biomasa, el pH de la disolución juega un papel crucial en la síntesis verde de estos compuestos. Según varios artículos, el pH del medio es responsable de la formación de MNPs de diversas formas, tamaños y tasas de biorreducción (Haytham, 2015), (Bagherzade et al., 2017) (Kumar et al., 2019).

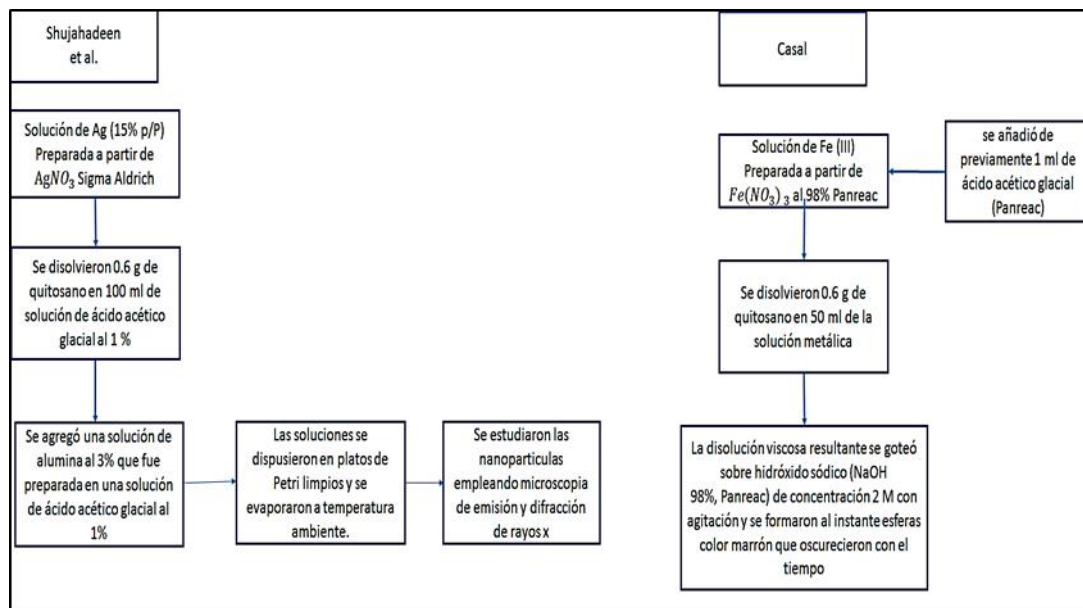


Figura 26. Procedimiento para la obtención de NPs de hierro y plata según trabajos precedentes empleando quitosano.

Otro aspecto importante a considerar es la influencia del pH en la formación de las estructuras poliméricas que sirven de estabilizadores, debido a que interviene en la interacción con el biopolímero que estabiliza la estructura. La Figura 30 muestra el efecto del pH propuesto por Pereira y colaboradores (2019) para la formación de AgNPs. En el caso de las AuNPs estudiadas (Franconetti, et al., 2018) (Prado-Gotor, et al., 2014) los resultados obtenidos sugieren la formación de un anión complejo de cloruro de oro que es atraído electrostáticamente por las cargas parciales amino que se encuentran en el quitosano, lo cual le da estabilidad a las estructuras que se forman.

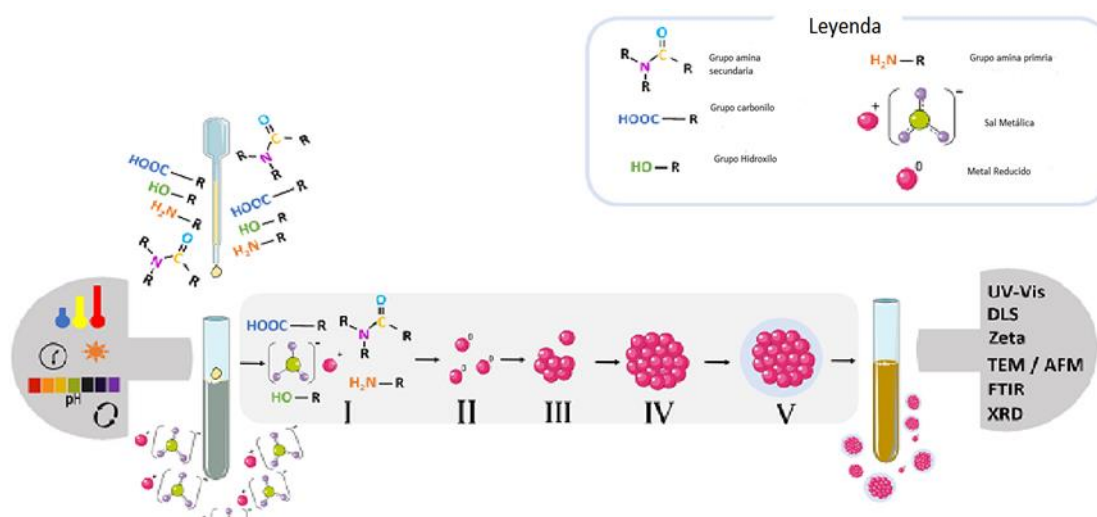


Figura 27. Influencia del pH en la formación de AgNPs con la intervención de un polisacárido. (Pereira et al., 2019)

En el caso del alginato el pH influye de una manera diferente, ya que ocurre la hidrofiliación de los polisacáridos, formando cargas negativas en los grupos hidroxilo presentes en alginato (Sun & Tan, 2013). El resultado es el incremento de la viscosidad de las disoluciones a medida de que el pH aumenta. (Lee & Mooney, 2012)

Zhang et al. (2018) encapsuló nanopartículas de proteína de soja hidrolizada y resveratrol el cual es un poderoso antioxidante. Los autores aseguran que el valor de pH óptimo para que ocurra el encapsulamiento del resveratrol es 3,5 y que el proceso de encapsulado comienza a valores de pH superiores a 1. Sin embargo, cuando el pH se encuentra en un valor de 2 ocurre el fenómeno de repulsión de fuerzas entre el alginato y el resveratrol, lo que hace que precipite y esto a su vez hace que haya bajo encapsulamiento en el alginato.

Se han realizado estudios en un rango de pH comprendido entre 1 y 11, observándose la formación de nanoesferas de pequeño tamaño por encima de pH 8 (Sathishkumar, et al. 2009). Sin embargo, estas condiciones no aplican en el caso del uso de estabilizadores debido a que la estructura del alginato deja de disponer de los grupos hidroxilos y el encapsulamiento no tiene lugar. (Zhang et al. 2018)

En la Figura 28 se muestra el procedimiento experimental que proponen Sun y Tan (2013) y que de forma ilustrativa representa el proceso de formación de las MNPs encapsuladas, el cual concuerda con el que presentó Casal (2015).

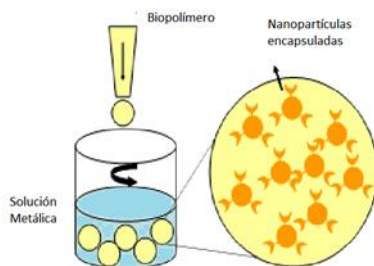


Figura 28. Proceso de formación de nanoesferas metálicas encapsuladas con alginato (Sun & Tan, 2013).

### 5.1.3. Tiempo de contacto

Este parámetro es de gran interés desde dos puntos de vista: el primero es el tiempo necesario para la formación de las nanoestructuras y el segundo tiene que ver con el tiempo que debe estar en contacto las MNPs para hacer la retención efectiva de contaminantes.

El primer caso no es objeto de estudio de este trabajo de investigación, ya que los tiempos de formación de las MNPs fueron determinados por Casal (2015). Además es conocido que, cuando en el proceso de obtención participa un agente estabilizante, los tiempos no son un problema a superar, pues los tiempos de retención son relativamente cortos; en el peor de los casos se tiene que a los 10 minutos se consiguen estructuras muy bien definidas (Zhang et al., 2018).

Por otra parte, los tiempos de retención para la reducción de la concentración de contaminantes ha sido estudiado ampliamente y servirán de base para el presente trabajo. Fiol y colaboradores (2005) establecieron un tiempo mínimo de 20 minutos y un máximo de 30 minutos para la eliminación del 42% de Cr(VI). Casal (2015) establece que a partir de los 50 minutos logró la eliminación de 34 % de Cr(VI)

Otro aspecto importante a considerar es que el trabajo de Fiol (2005) no indica el método experimental en que se llevó a cabo la determinación de cromo hexavalente que se retiró, solo hace un estudio de la representación del comportamiento del fenómeno de adsorción, determinando la isoterma de adsorción que mejor se ajusta al estudio que realizó. La Figura 29 muestra los esquemas de experimentación de los trabajos usados como referencia.

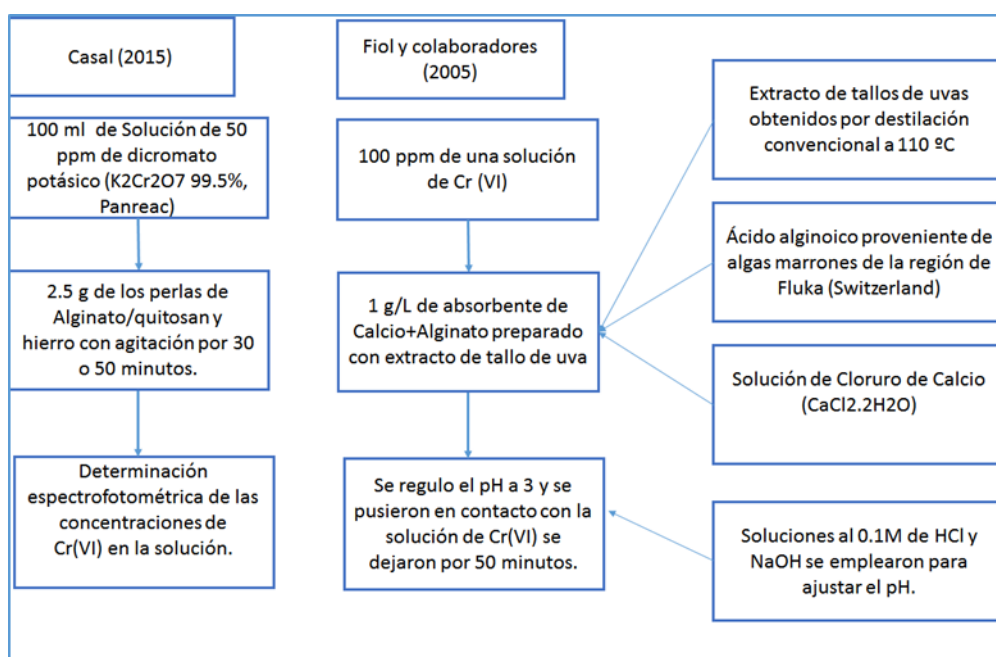


Figura 29. Diseño experimental para la extracción de cromo hexavalente en trabajos previos.

## 5.2. Esquema experimental propuesto

Basados en los trabajos de investigación precedentes se propone sintetizar MNPs para descontaminar AMDs gracias a la eliminación de metales pesados, tales como As, Pb, Cd, Hg (Olías, et al., 2004). El esquema de experimentación que se propone es el siguiente:

Se realizará el estudio de la eliminación de cromo hexavalente variando dos polisacáridos, el alginato y el quitosano. Para cada biopolímero se estudiará la influencia del tamaño de la perla formada, aprovechando la disponibilidad del equipo encapsulador Büchi; además se verá el efecto del pH a dos niveles (1 y 3). Finalmente, se estudiará el efecto de los tiempos de contacto en la eliminación de Cromo (VI).

Los ensayos propuestos son:

### **5.2.1. Preparación del extracto vegetal y disolución del polisacárido.**

Preparación de la disolución del polisacárido:

- Alginato:

De acuerdo a lo propuesto por Casal (2015), se plantea la siguiente ruta de obtención:

*Materiales:*

- Ácido algínico (Sigma) 0,5 g
- Agua desionizada 25 ml

El Alginato se disuelve por agitación magnética hasta conseguir una disolución homogénea.

- Extracto Vegetal

Se tomará el procedimiento de Arenas (2017) para la obtención del extracto de raspo de uva.

*Materiales:*

- Raspo de uva.
- Agua desionizada.
- Trituradora.
- Ultrasonido Selecta.
- Tamizadora y tamiz Filtra de 1 milímetro.
- Matraz de fondo redondo de capacidad de 500 mililitros.
- Condensador.
- Termómetro.
- Manta calefactora.
- Embudo Büchner y papel de filtro Whatman No.1.
- Centrífuga.
- Estufa.

Se prepara la biomasa cortando inicialmente los tallos de la planta mediante unas tijeras, haciendo cortes menudos. Luego se pasa por una trituradora para tener partículas más finas que luego son pasadas por un tamiz para asegurar una distribución homogénea del tamaño de la biomasa. Se debe realizar un lavado con agua desionizada, luego se somete a un baño con ultrasonido, y finalmente se introduce en la estufa 24 horas a 110 °C para eliminar el agua presente.

Una de las conclusiones del estudio de Arenas (2017) es que la concentración de polifenoles y azúcares reductores que se obtienen de los extractos no varía significativamente con los tiempos de reflujo por lo que se dejarán en proceso de extracción 10 minutos. El montaje empleado se muestra en la Figura 3030. La temperatura se fijó a 100°C e inicialmente se partió de 3g de raspo de uva en 100ml de agua desionizada.





Figura 30. Montaje del sistema de reflujo para la preparación del extracto de rapo de uva.

Para la separación del extracto de la biomasa, Arenas (2017) determinó la centrifugación como el mejor método de separación, por lo que se realizará la centrifugación del extracto obtenido a 5000 r.p.m. durante 10 minutos, por último, se enrasa a 100 ml para tener el mismo volumen inicial.

- Síntesis verde de las MNPs.

Para la obtención de las MNPs de hierro se seguirá el procedimiento de Casal (2015). La diferencia de la investigación propuesta con el trabajo de Casal es el origen de la materia orgánica que debe reducir el ion metálico, de forma análoga a como se formaron las AgNPs.

Materiales:

- Ultrasonidos Selecta.
- Nitrato nonahidratado ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  98%, Panreac).
- Vaso de precipitados.
- Matraz aforado.
- Pipetas graduadas.

La síntesis de nanopartículas de hierro se lleva a cabo haciendo mezclas 1:1 en volumen de los extractos obtenidos con una disolución 0.1 M de Fe (III) preparada a partir del nitrato. La síntesis se realizó goteando la disolución de hierro sobre el extracto con sonicación (Casal, 2015).

- Regulación del pH.

Según lo estimado por el diseño experimental se deben preparar 4 muestras a un pH de 1 y 4 muestras a un pH de 3. Para regular el pH se empleará el procedimiento descrito por Fiol (2005) para obtener valores estables de este parámetro con disoluciones 0.1M de HCl y NaOH.

Materiales:

- pH-metro.
- Disoluciones 0,1M de HCl y NaOH.
- Micropipetas para la dispensación exacta de base y ácido según sea pertinente.

- Encapsulación de las MNPs.

Para la encapsulación de las MNPs se realizará el goteo controlado de la disolución de alginato desde el equipo encapsulador, sobre la disolución metálica para formar las nanoesferas de hierro. Este procedimiento propuesto por Chan (2009) se muestra en forma esquemática en la Figura 31.

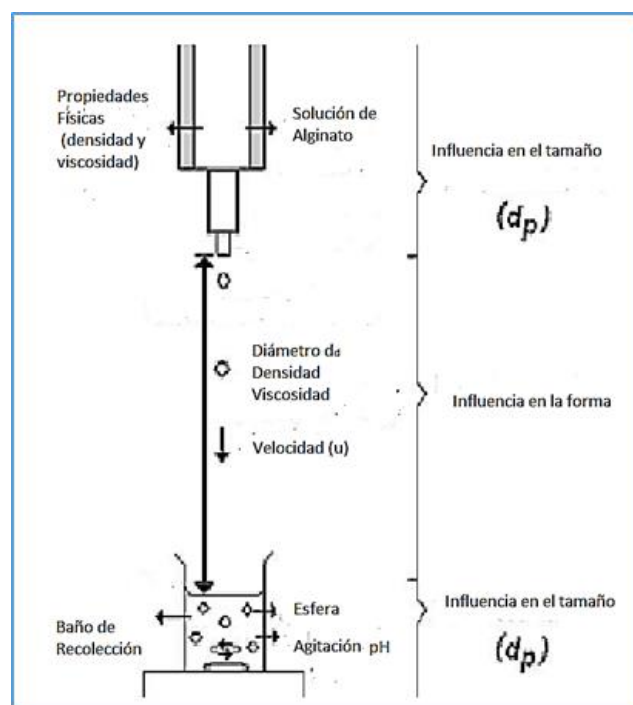


Figura 31. Esquema de las variables de proceso involucradas en la encapsulación de las MNPs empleando un equipo encapsulador (Chan et al., 2009).

Se ajustarán los parámetros en la encapsuladora de manera que forme dos tamaños de esferas y se obtendrán 4 muestras para 60 nm y 4 muestras a 80 nm. De las cuales las muestras identificadas con los números 1, 2, 5 y 6 tendrán un pH de 3 y el resto (3, 4, 7 y 8) tendrán un pH de 1.

- Eliminación de Cromo (VI)

Para esta parte se empleará la metodología de Casal (2015), se colocará en contacto la disolución de Cromo (VI) y las MNPs de hierro estimando dos tiempos de contacto: 30 y 50 minutos respectivamente. Se emplearán 8 disoluciones de cromo hexavalente y se les agregará 2,5 g de las perlas de alginato a 100 ml de las disoluciones de cromo a una concentración de 50 ppm.

**Materiales:**

- Dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$  99.5%, Panreac)
- Agua Destilada.
- Matraz Aforado.
- Vaso de precipitado.

Las muestras etiquetadas como 1, 2, 3, 4 serán dejadas por 30 minutos en constante agitación de manera de mantener en contacto con las nanoestructuras y luego la disolución será estudiada para determinar la cantidad de cromo (VI) y Cr (III) extraído. Luego las muestras etiquetadas con 5, 6, 7, 8 serán dejadas por 50 minutos y se retirarán las perlas para medir la cantidad de metal extraído.

Uno de los resultados más importantes de Casal (2015) es que la adsorción es más eficaz a pH bajos. La explicación puede darse por dos vías, por un lado, a altas concentraciones de protones la superficie del adsorbente adquiere carga positiva y se establecen fuerzas atractivas con los iones dicromato, produciéndose la adsorción de estos aniones por interacciones electrostáticas. Por otro lado, a estos valores de pH bajos también se ve favorecida la posible reducción a Cr(III) una vez entran en contacto los iones dicromato con el hierro, produciéndose la quimisorción del Cr(III) en la superficie de los óxidos de hierro por sustitución metálica. Debido a todo esto se espera una mayor eliminación de cromo en las muestras con pH cercano a 1. (Casal, 2015)

El mismo esquema experimental se presenta para la formación de las perlas de quitosano, la diferencia estará en la forma en que se prepara la disolución del biopolímero. Pero el resto de los procedimientos, la obtención del extracto, la obtención de las MNPs, la regulación del pH y la preparación de las disoluciones de cromo hexavalente se realiza de la misma forma que se realizó por Casal (2015), Fiol (2006) y Arenas (2017).

Para la preparación de la disolución del quitosano emplearemos la metodología descrita por Shujahadeen (2019) en cuyos experimentos se disolvieron 0.6 g de quitosano en 100 ml de disolución de ácido acético glacial al 1 %.

La determinación espectrofotométrica se basa en la realización de una curva de calibración que cubre un rango extenso donde se considera que se encuentra la concentración de cromo hexavalente a determinar. En este caso Casal, (2015) fue desde 0 hasta 1 ppm, las cuales fueron obtenidas a partir de la disolución madre de 50 ppm empleada en la preparación de la disolución de cromo hexavalente que fue sometida a absorción.

El cromo hexavalente se basa en la formación de un complejo de cromo con la 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, cuya estructura se muestra en la Figura 322. Este complejo de color rojo violáceo presenta un máximo de absorción a 540 nm.

Este método de determinación es específico al Cr(VI), ya que con el Cr(III) la reacción con la difenilcarbazida no se produce. Sin embargo, algunos metales como el hierro o el vanadio pueden formar otro tipo de complejos coloreados y su presencia en la muestra puede ocasionar interferencias.

Las medidas deben efectuarse en un espectrofotómetro.

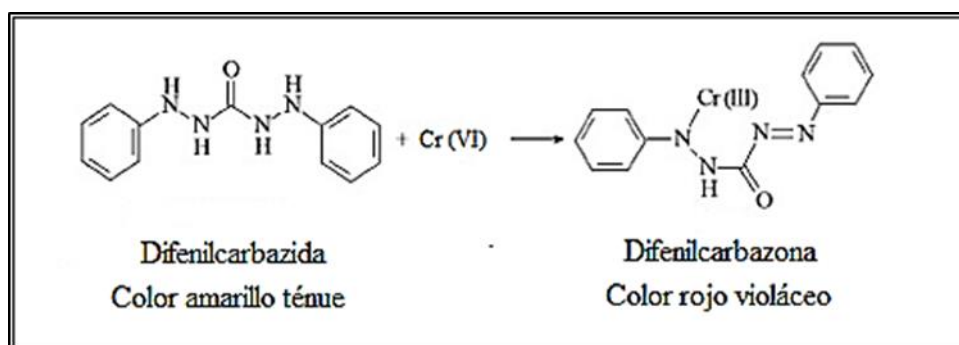


Figura 32. Estructura de la difenilcarbazida y el complejo formado con cromo. (Casal, 2015)

Para este trabajo de investigación las variables ortogonales o independientes serán el tipo de polisacárido a emplear, los cuales serán alginato (Németh, 2015), (Casal, 2015) y quitosano (Chan, 2018).

Las variables que forman el conjunto K son definidas en la Tabla 2 de acuerdo a la experiencia previa de los autores indicados.

Esta configuración tiene como resultado una tabla de experimentación que puede extenderse sobre las variables base o las variables K, según se requiera.

Tabla 2. Diseño de experimentos para cada tipo de polisacárido a emplear.

Variable a Estudiar	Rango +	Rango -	Autor
Tamaño de la esfera	80 nm	60 nm	(Velimirovic, 2016) (Casal, 2015)
pH	1	3	(Arenas, 2017) (Ibrahim, 2015)
Tiempo de contacto	30 minutos	50 minutos	(Ibrahim, 2015)

Inicialmente la tabla de efectos de cada caso base queda como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Rango de las variables que se estudiarán

Alginato de Sodio			Quitosano		
Variable a Estudiar	Rango +	Rango -	Variable a Estudiar	Rango +	Rango -
Tamaño de la esfera	80 nm	60 nm	Tamaño de la esfera	80 nm	60 nm
pH	1	3	pH	1	3
Tiempo de contacto	50 minutos	30 minutos	Tiempo de contacto	50 minutos	30 minutos

Es importante destacar que una vez obtenidas las MNPs, éstas deben ser caracterizadas, de manera que el número de muestras obtenidas, ocho en total, serán objeto de determinación de los ensayos de caracterización explicados en el apartado 3.2.

Se busca estudiar efectos de 3 factores sobre una variable respuesta, considerando dos niveles o variantes para cada factor.

La matriz de efectos de los resultados se muestra a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4. Matriz de efectos para el diseño de experimentos planteado.

Prueba	Tamaño de Esfera (nm)	pH	Tiempo de Contacto(min)
1	60	3	30
2	80	3	30
3	60	1	30
4	80	1	30
5	60	3	50
6	80	3	50
7	60	1	50
8	80	1	50

Para determinar el porcentaje de recuperación del Cromo, se deberán estudiar las muestras por colorimetría. Las medidas se efectuarán en el espectrofotómetro. El calibrado se realizará en el rango de 0-1 mg/L a partir de una disolución stock de 50 ppm de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ).

### 5.3. Cálculos de preparación de las muestras

Basados en el diseño experimental planteado en el apartado 5.3, se requieren un número de muestras para que se lleve a cabo la encapsulación con quitosano y alginato. La Figura 33 muestra la estructura de los diferentes ensayos para la fabricación de MNPs de hierro encapsuladas y del estudio de la extracción de Cr (VI).

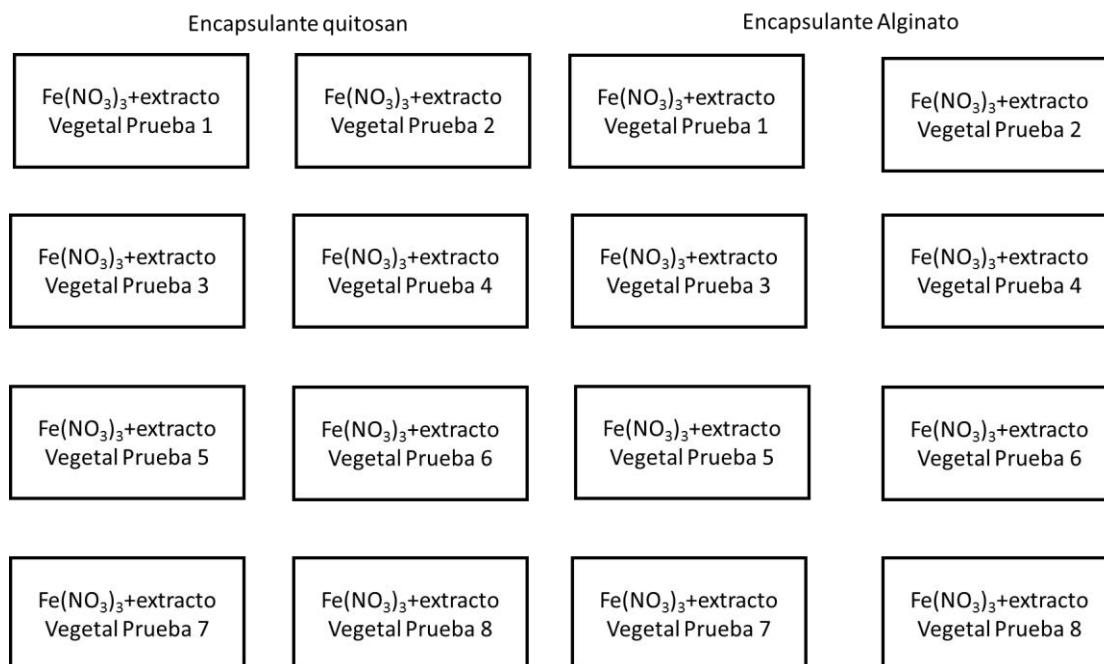


Figura 33. Esquema de experimentación propuesto.

En la secuencia de experimentación se tiene que el primer paso es la formación de nanopartículas de hierro, la cual se lleva a cabo cuando se mezcla la disolución de Fe<sup>3+</sup> con el extracto vegetal en una proporción 1:1, por lo cual se plantea preparar alícuotas de 100 ml de esta mezcla.

### 5.3.1. Preparación de la disolución metálica:

Para la preparación de las disoluciones metálicas se deben preparar 16 disoluciones 0,1 M de 50 ml, lo que da un total de 800 ml.

Se estima que se prepararía 1 L de disolución 0,1 M. El cálculo de la cantidad de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 9H<sub>2</sub>O al 98%. P/p es:

$$\text{Molaridad (M)} = \frac{\text{Número de Moles (n)}}{\text{Volumen de solución (V)}}$$

$$n = M \times V$$

$$n = \frac{\text{masa(m)}}{\text{Peso Molecular (PM)}}$$

$$\% \text{pureza} = \frac{\text{masa sin impurezas}}{100 \text{ g sustancia pura}} = 0.98$$

$$m = n \times PM = M \times V \times PM$$

$$m = 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 1\text{L} \times 241.86 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 24.18 \text{ g}$$

Sin embargo la masa a pesar debe ser:

$$m_{\text{muestra}} = \frac{24.18\text{g}}{0.98} = 24.67 \text{ g}$$

### 5.3.2. Preparación del extracto vegetal.

El procedimiento mostrado en el apartado 5.2.1 debe repetirse ocho veces, haciendo una extracción sólido-líquido que utiliza como disolvente una mezcla 1:1 de etanol agua. Para la fabricación de cada extracto se necesitan 300 ml de la mezcla. Esto se traduce en 1200 ml de etanol (EtOH 96% v/v, Panreac). Se debe disponer entonces de al menos 1200 ml de etanol y de agua desionizada. (Casal, 2015)

### 5.3.3. Preparación de las disoluciones de los polisacáridos

Para la preparación del alginato se necesitan 0,5 g de ácido algínico en 25 ml de agua. Se asume que la cantidad de disolución de polisacárido a colocar en el recipiente a presión de la máquina encapsuladora necesitaría 250 ml de alginato.

$$\text{masa de alginato} = \frac{0.5 \text{ g de ácido}}{25 \text{ ml de solución}} \times 250 \text{ ml de solución} = 5 \text{ g de ácido}$$

Para la preparación del quitosano, se necesitan 0,6 g de quitosano en 100 ml de una disolución de ácido acético glacial al 1%.

Si se desean preparar 250 ml de disolución se requiere realizar un cálculo similar al anterior:

$$\text{masa de quitosano} = (0.6 \text{ g de ácido}) / (100 \text{ ml de solución}) \times 250 \text{ ml de solución}$$

$$\text{masa de quitosano} = 1.5 \text{ g}$$

Para preparar la disolución de ácido acético glacial se necesita:

$$\text{Vol de ácido concentrado} = 250\text{ml de solución} \times \frac{1 \text{ ml ácido concentrado}}{100 \text{ ml de solución}}$$

$$\text{Vol de ácido concentrado} = 2.5 \text{ ml ácido concentrado}$$

### 5.3.4. Preparación las disoluciones de Cr (VI)

Se prepararán 16 alícuotas de 100 ml de una disolución de 50 ppm de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  por lo que se necesitan 1600 ml de la disolución. Se plantean a continuación los cálculos para 2 litros de disolución de dicromato de potasio.



$$\text{masa de dicromato} = \text{Volumen de la solución} \times \text{Concentración} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)$$

$$\text{masa de dicromato} = 2 \text{ L} \times \frac{50 \text{ mg}}{\text{L}} = 100 \text{ mg}$$

$$\text{masa real} = \frac{100 \text{ mg}}{0.995} = 100.5 \text{ mg}$$



## 6. Conclusiones

Se ha propuesto el diseño experimental para la recuperación de metales pesados, en este caso de cromo hexavalente, proveniente de una disolución metálica.

Se ha realizado el diseño experimental basado en la selección de un agente encapsulante para las MNPs de hierro. Se han propuesto el alginato de sodio y el quitosano, los cuales han presentado numerosas ventajas en su uso como estabilizante en la síntesis verde de nanopartículas de hierro.

Se han establecido los rangos de variación de tres parámetros a considerar: el tamaño de partícula, el pH y el tiempo de retención.

El tamaño de la microcápsula variará de acuerdo a experiencias previas, empleando un equipo encapsulador, en un rango que variará desde 60 hasta 80 nm.

El pH se estudia a 1 y 3, debido a que se ha demostrado que a valores bajos se consigue la formación de MNPs estables y además se promueve la extracción de los metales pesados, como es el caso del cromo hexavalente.

Los tiempos de contacto utilizados se basan en los tiempos mínimos establecidos con anterioridad para los diferentes polisacáridos y sus condiciones de pH y tamaño de partícula.

Se recomienda el estudio de la morfología de las MNPs formadas con análisis microscópicos para establecer parámetros óptimos de obtención, tales como viscosidad y la densidad de la disolución de alginato y quitosano.

Se propone como vía de continuación extender el método experimental a metales escasos presentes en las AMDs y estudiar el porcentaje de recuperación en función de las variables propuestas.

Se propone como vía de continuación estudiar la recuperación de metales escasos sintetizando directamente sus nanopartículas homólogas utilizando los polisacáridos propuestos como agentes encapsuladores.



## 7. Presupuesto y análisis económico

### 7.1. Estudio bibliográfico y dedicación.

Este trabajo de investigación propone un esquema de experimentación que se basa en una exhaustiva revisión de bibliografía sobre el uso de MNPs en la remediación de acuíferos contaminados con metales pesados.

Puede considerarse entonces las horas de dedicación a la investigación. Se consultaron 48 artículos de revistas científicas, 3 trabajos finales y un proyecto de investigación de los cuales se extrajeron los antecedentes y se eligieron los parámetros a estudiar.

En su mayoría las búsquedas se realizaron en la plataforma *Science Direct* por lo que la selección de las bibliografías puede estimarse en aproximadamente 5 horas por artículo seleccionado.

La lectura de cada artículo y la extracción de la información de interés pueden ser estimadas con un tiempo de duración de 4 horas por trabajo de investigación consultado.

Por último la redacción de éste documento, la adecuación en el formato adecuado y la edición de las figuras originales al idioma castellano pueden ser estimadas en horas de dedicación como 5 horas por artículo.

La Tabla 5 muestra el total de horas empleadas en este trabajo de investigación.

Tabla 5. Dedicación del estudiante en horas

Actividad	Dedicación (h)
Documentación	240
Lectura y extracción de Información	192
Redacción	240
Total	672

Otro aspecto importante a considerar es el tiempo invertido por el tutor en el desarrollo de la investigación por lo que se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Dedicación del tutor en asesoramiento y corrección del TFG

Actividad	Dedicación (h)
Reuniones con el estudiante	15
Corrección	30
Total	45

Para calcular el costo total partimos de las siguientes cifras:

- Según la bolsa de prácticas de la UPC, el precio orientativo que cobra un estudiante en prácticas es de 8€/h.
- Según el Boletín Oficial del Estado (BOE 140), el salario del director del TFG, en el que se tiene en cuenta la Seguridad Social (SS) correspondiente al 32% del Salario Bruto Anual (SBA), es 23,5€/h.

De esta forma el coste total se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Coste total del personal implicado en el proyecto.

	Dedicación (h)	Precio (€/h)	Sueldo Total (€)
Estudiante	672	8	5376
Tutor	45	23,5	1057,5
Total			6433,5

## 7.2. Presupuesto del diseño experimental.

La Tabla 8 muestra el presupuesto de las materias primas usadas en el esquema de experimentación:

Tabla 8. Presupuesto de la materia prima del esquema experimental propuesto.

Actividad	Materia Prima	Cantidad requerida	Precio por unidad	Total
Preparación de la disolución metálica	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	24.67 g	1€/g	24,67€
Preparación del extracto vegetal.	Etanol (96%)	1000 ml	23,8€/L	23,80€
Preparación de las disoluciones de los polisacáridos	Ácido algínico	5 g	0,005€/g	0,03€
	Quitósano	1.5 g	0,005€/g	0,01€
	Ácido acético	2.5 ml	8152€/L	20,38€
Preparación de las disoluciones de Cr (VI)	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	100 mg	586€/g	58,60€

**Presupuesto total de la materia prima = 127,49 €.**

Otro aspecto importante a considerar son los instrumentos que se requieren y que han sido listados a lo largo del apartado 5.2. Para estimar los costes, se asume una amortización general y homogénea, obteniendo los resultados de la Tabla 9.

Tabla 9. Presupuesto de amortización de los equipos utilizados.

Equipo	Precio inicial (€)	Vida útil (años)	Utilización (años)	Coste (€)
Encapsuladora Büchi B-390	20.000	20	0,25	250
Ultrasonidos Selecta	1.500	25	0,25	15
Trituradora genérica	200	10	0,25	5
Total				270€

## **8. Análisis del impacto ambiental**

El desarrollo de tecnologías verdes para la obtención de MNPs, implica no sólo la inocuidad de los elementos de fabricación empleados en estas rutas de obtención, sino que también se busca eliminar subproductos que generalmente son pasivos ambientales y que tradicionalmente se obtienen en la síntesis de MNPs.

Otro aspecto importante a considerar, es que la razón principal por la que se realiza esta investigación es la eliminación de metales pesados de las AMDs, con el objetivo de que las cuencas fluviales y los acuíferos de la zona tengan concentraciones más bajas de estos elementos tóxicos.

Durante la experimentación suelen generarse desechos de diferente naturaleza los cuales son calificados para su almacenaje mientras se planifica su disposición final. El procedimiento para el manejo de desechos se muestra a continuación:

- Almacenar correctamente los recipientes de los residuos generados hasta su recogida por el personal de la empresa gestora, evitando en todo momento que la presencia de dichos residuos en nuestras instalaciones suponga un riesgo para el personal que desarrolla sus trabajos en las mismas así como para terceras personas.
- Tratar los residuos de MNPs como si se tratase del mismo metal macroscópico.
- Evitar que los recipientes sean llenados más del 90% de su capacidad, evitar los derrames y mantenerlos debidamente cerrados.
- Solicitar los envases y etiquetas que necesiten para el correcto tratamiento de los residuos generados.
- Retirar, con sus propios medios, los envases del lugar de almacenamiento que se haya elegido.
- Informar inmediatamente al Servicio de Prevención cualquier irregularidad o incidente relacionado con la producción, manipulación y almacenamiento de residuos peligrosos.

El almacenamiento tiene que dar énfasis en las propiedades de los materiales residuales, considerando la generación de pequeñas cantidades y almacenamiento de corta duración; la disponibilidad de un sector claramente señalizado, estar provisto de carteles de advertencia, separado de eventuales fuentes de ignición, provisto de barreras físicas que impidan el contacto con otros recipientes y que permitan la contención de fugas o derrames. Cada recipiente debe exhibir de manera clara y visible el rótulo de identificación del Grupo al que pertenece su contenido (Llamas & Mercante, 2009).

Se sugiere llevar un control exhaustivo de los reactivos empleados mediante un registro donde se solicite información como la de la Tabla 10.



Este documento debe ser liderado por el responsable de la gestión de residuos generados durante la investigación, por lo que es este responsable el que lleva a cabo los estudios y análisis correspondientes.

Tabla 10. Tabla para la recogida interna de residuos peligrosos

<b>Tipo de Residuo</b>	<b>Tipo de envase</b>	<b>Cantidad de envases</b>	<b>% de llenado</b>
Disolución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$			
Sobrenadante rico en etanol			
Disolución de Ácido Acético			
Disoluciones de Polisacáridos			
Disoluciones de Cr (VI)			



## 9. Bibliografía

Ahmed, S., Ahmad, M., & Swami, B. L. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using Azadirachta indica aqueous leaf extract. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.06.006>

Álvarez-Gil, L, J Guerra, & N Rojas. “Factorial design 2k applied to the reological characterization of kaolin suspensions”, Prospectiva, Vol 16, N° 1, 18-25, 2018.

Araújo, R., Meira, A. C., & Fiúza, A. (2015). The use of nanoparticles in soil and water remediation processes.. Materials Today: Proceedings, 2(1), 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.04.055>

Arenas, Cristina. Síntesis de nanopartículas metálicas a partir de raspo de uva. Barcelona: TFG Universidad Politècnica de Catalunya, 2017.

Attar, K., Bouazza, D., Miloudi, H., Tayeb, A., Boos, A., Sastre, A. M., & Demey, H. (2018). Cadmium removal by a low-cost magadiite-based material: Characterization and sorption applications. Journal of Environmental Chemical Engineering, 6(4), 5351–5360. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.08.014>

Bagherzade, G., Tavakoli, M. M., & Namaei, M. H. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (Crocus sativus L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(3), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.014>

Bastos-arrieta, J., Florido, A., Clara, P., & Serrano, N. (2018). Green Synthesis of Ag Nanoparticles Using Grape Stalk Waste Extract for the Modification of Screen-Printed Electrodes. Nanomaterials, 8(946). <https://doi.org/10.3390/nano8110946>

Beulah, P, U Jinu, y M. Ghorbanpour. (2018) Chapter 14 - «Green Engineered Chitosan Nanoparticles and Its Biomedical Applications—An Overview.»

Bhateria, R., & Singh, R. (2019). Journal of Water Process Engineering A review on nanotechnological application of magnetic iron oxides for heavy metal removal. Journal of Water Process Engineering, 31(May), 100845. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100845>

BoMoghaddam, A. B., Namvar, F., Moniri, M., Tahir, P., Azizi, S., & Mohamad, R. (2015). Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical

Applications. *Molecules*, 20, 16540–16565. <https://doi.org/10.3390/molecules200916540>

Cánovas, C., Riera, J., Carrero, S., & Olías, M. (2018). Dissolved and particulate metal fluxes in an AMD-affected stream under different hydrological conditions: The Odiel River (SW Spain). *Catena*, 165(January), 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.02.020>

Casal, Paula. Síntesis de nanopartículas con propiedades adsorbentes mediante métodos de química sostenible. Universidade da Coruña – Tesis Doctoral –Facultade de Ciencias, 2015.

Chan, E., Lee, B., Ravindra, P., & Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion – dripping method. *Journal of Colloid And Interface Science*, 338(1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.05.027>

Danish, E., & Gundabala, V. (2017). Controlled fabrication of multi-core alginate microcapsules. *Journal of Colloid And Interface Science*, 507, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.100>

Dubey, M., Bhadauria, S., & Kushwah, B. S. (2009). GREEN SYNTHESIS OF NANOSILVER PARTICLES FROM EXTRACT OF EUCALYPTUS HYBRIDA ( SAFEDA ) LEAF. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(3), 537–543.

Favas, P., Sarkar, S. K., Rakshit, D., & Perumal, V. (2017). Acid Mine Drainages From Abandoned Mines : Hydrochemistry , Environmental Impact , Resource Recovery , and Prevention of Pollution. (December), 414–449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803837-6.00017-2>

Fiol, N., Poch, J., & Villaescusa, I. (2005). Grape stalks wastes encapsulated in calcium alginate beads for Cr(VI) removal from aqueous solutions. *Separation Science and Technology*, 40(5), 1013–1028. <https://doi.org/10.1081/SS-200048041>

Franconetti, A., Carnerero, J. M., Prado-gotor, R., Cabrera-escribano, F., & Jaime, C. (2019). Chitosan as a capping agent: Insights on the stabilization of gold nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 207(August 2018), 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.046>

Gomathi, M., Rajkumar, P. V, Prakasam, A., & Ravichandran, K. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using *Datura stramonium* leaf extract and assessment of their antibacterial activity. *Resource-Efficient Technologies*, 3(3), 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.12.005>

Haytham, I. (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(3), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.007>

He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., & Gu, N. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, 61, 3984–3987. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.01.018>

Heera, P., & Shanmugam, S. (2015). Nanoparticle Characterization and Application : An Overview. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 4(8), 379–386.

Hongfei, L, Xueliang & Wang, Wei & Tan, Fatang & Sun, Fazhe & Xiao, Zunqi & Chen, Jianguo. (2014). Effective removal of cadmium ions from aqueous solution using chitosan-stabilized nano zero-valent iron. *Desalination and Water Treatment*. 56. 1-10. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.934727>

Iravani, S. (2011). Green Chemistry Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13, 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/c1gc15386b>

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles : Properties , applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Kitching, M., Ramani, M., & Marsili, E. (2015). Fungal biosynthesis of gold nanoparticles : mechanism and scale up. *Microbial Biotechnology*, 8(6), 904–917. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12151>

Krishnaswamy, K., Vali, H., & Orsat, V. (2014). Value-adding to grape waste : Green synthesis of gold nanoparticles. *Journal of food engineering*, 142, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.014>

Kumar, I., Mondal, M., & Sakthivel, N. (2019). Chapter 3 - Green synthesis of phytogetic nanoparticles. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00003-4>

Lee, K., & Mooney, D. (2013). Alginate : properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.Alginate

Lupo, B., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos . Técnicas y aplicaciones Microencapsulation in alginate for food . Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130–151.

Madzokere, T. C., & Karthigeyan, A. (2017). Heavy Metal Ion Effluent Discharge Containment Using Magnesium Oxide ( MgO ) Nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*, 4(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.01.187>

Mahato, R. (2017). Multifunctional Micro- and Nanoparticles. In Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery, and Medical Devices. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42978-8.00002-4>

Makarov, V. V, Love, A. J., Sinitsyna, O. V, Makarova, S. S., & Yaminsky, I. V. (2014). “ Green ” Nanotechnologies : Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Acta Naturae*, 6(20), 35–44.

Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>

Olías, M., Nieto, J. M., Sarmiento, A. M., & Cero, J. C. (2004). Seasonal water quality variations in a river affected by acid mine drainage : the Odiel River ( South West Spain ). *Science of the Total Environment*, 333, 267–281. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.012>

Pereira, T. M., Silva, L. P., & Bonatto, C. C. (2019). Chapter 7 - Frontiers and perspectives in the green synthesis of silver nanoparticles. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00007-1>

Piao, X., Ming, G., Lian, D., Ling, C., Hu, S., & Hua, M. (2012). Science of the Total Environment Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment : A review. *Science of the Total Environment*, The, 424, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.023>

Prado-gotor, R., López-pérez, G., Martín, M. J., Cabrera-escribano, F., & Franconetti, A. (2014). Use of gold nanoparticles as crosslink agent to form chitosan nanocapsules : Study of the direct interaction in aqueous solutions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 135, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.03.005>

Prasad, G., Ghule, N. W., Haque, A., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis : An overview on methods of preparation , advantages and disadvantages , and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53(July 2018), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>

Ramzan, H., & Yousaf, Z. (2018). Chapter 4. Green fabrication of metallic nanoparticles. In *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813661-4.00004-3>

Ravindra, S., Mohan, Y. M., Reddy, N. N., & Raju, K. M. (2010). Fabrication of antibacterial cotton fibres loaded with silver nanoparticles via “ Green Approach .” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 367, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.06.013>

Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S. W., Cho, C., Kim, S., & Yun, Y. (2009). Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal

activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.005>

Shakeel, A., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications : A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>

Shujahadeen, B., Abdulwahid, R. T., & Woo, H. J. (2019). Increase of metallic silver nanoparticles in Chitosan : AgNt based polymer electrolytes incorporated with alumina fi ller. *Results in Physics*, 13(February), 102326. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102326>

Stark, W. J., Stoessel, P. R., Wohlleben, W., & Hafner, A. (2015). Industrial applications of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev*, 44, 5793–5805. <https://doi.org/10.1039/c4cs00362d>

Sun, J., & Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*, 6, 1285–1309. <https://doi.org/10.3390/ma6041285>

Szekalska, M., Agata, P., Emilia, S., Ciosek, P., & Winnicka, K. (2016). Alginate : Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*, 2016, 1–17.

Thakur, S., Sharma, B., Verma, A., Chaudhary, J., Tamulevicius, S., & Kumar, V. (2018). Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications. *Journal of Cleaner Production*, 198, 143–159. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.259>

Titus, D, Jebaseelan, S Selvaraj, y M Roopan. «Nanoparticle characterization techniques.» Chapter 12. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, 2019: 304-318.

Velimirovic, M., Schmid, D., Wagner, S., Micić, V., von der Kammer, F., & Hofmann, T. (2016). Agar agar-stabilized milled zerovalent iron particles for in situ groundwater remediation. *Science of the Total Environment*, 563–564, 713–723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.007>

Yu, J., Nan, J., & Zeng, H. (2017). Size control of nanoparticles by multiple-pulse laser ablation. *Applied Surface Science*, 402, 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.01.094>

Zhang, L., Zhang, F., Fang, Y., & Wang, S. (2019). Alginate-shelled SPI nanoparticle for encapsulation of resveratrol with enhanced colloidal and chemical stability. *Food Hydrocolloids*, 90(December 2018), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.042>